



Ana Luísa Morais Gonçalves

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Design e fabrico de novos eléctrodos
impressos em papel para desenvolvimento
de biossensores enzimáticos com
aplicações biomédicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Elvira Fortunato, Professora Catedrática, FCT/UNL

Co-orientador: Gabriela Almeida, Investigadora Associada, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutora Ana Pimenta da Gama da Silveira Viana

Vogais: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2014

Ana Luísa Moraes Gonçalves

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Design e fabrico de novos eléctrodos
impressos em papel para desenvolvimento
de biossensores enzimáticos com
aplicações biomédicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Elvira Fortunato, Professora Catedrática, Departamento de Ciências dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Gabriela Almeida, Investigadora Associada, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutora Ana Pimenta da Gama da Silveira Viana

Vogais: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida

Design e fabrico de novos eléctrodos impressos em papel para desenvolvimento de biossensores enzimáticos com aplicações biomédicas

Copyright © 2014. Todos os direitos reservados. Ana Luísa Morais Gonçalves, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geoFiguras, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer às minhas orientadoras pela oportunidade de realizar este projecto. Tive o imenso privilégio e orgulho de trabalhar com a Professora Elvira Fortunato e com a Professora Gabriela Almeida, obrigada pelo apoio, pela presença constante e pela confiança depositada em mim.

Quero também agradecer às pessoas que me acompanharam neste projecto e que contribuíram para o sucesso do mesmo, Mafalda Costa, Célia Silveira, Patrícia Rodrigues, Daniela Salgueiro, Pawel Wojcik.

Aos meus amigos, Pedro Azevedo, Joana Reis, Andreia Serrano, Carolina Salgueiro, Inês Ropio, Carolina Fernandes que estiveram presentes ao longo destes cinco anos, obrigada pela vossa amizade nesta importante etapa da minha vida. Joana Reis foste a minha primeira amizade nesta jornada, foste uma amiga e uma irmã, obrigada por tudo. Andreia Serrano, depois das vastas horas ao telefone nestas últimas semanas penso que só posso acrescentar um obrigada. ☺ Um obrigada especial ao Pedro Azevedo, a quem agradeço a companhia constante nas longas jornadas de estudo, e a sua enorme paciência, foi um privilégio poder contar contigo como colega de todos os trabalhos e especialmente como amigo.

Ao meu namorado, João Miranda, obrigada por me teres apoiado, aconselhado e orientado ao longo deste percurso. Nunca te faltou tempo nem paciência para me ouvir e ajudar, estiveste sempre presente. Foste essencial para o meu sucesso nesta jornada. Muito obrigada.

Quero agradecer também aos meus amigos de infância, que ainda se mantêm em contacto e estiveram sempre lá para mim, Ana Vivas, Francesca Brito, José Garcia, Ana Borrego. Um obrigada especial à Francesca Brito, que fez questão de estar presente no primeiro e último dia da minha vida académica.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais e irmão pelo apoio e amor incondicional, e por terem sempre acreditado que eu era capaz.

Num mundo em crescente evolução é necessário tentar melhorar as condições de saúde global. Um factor importante para a prevenção e tratamento de doenças é o seu correcto diagnóstico. Uma vez que nem todos os países têm a mesma capacidade económica, existe a necessidade de se criar testes rápidos e baratos que possam ser acessíveis no mundo inteiro. Os *point-of-care tests*, como é o caso dos biossensores de glucose vastamente utilizados na monitorização da diabetes, apresentam uma solução para este problema. Os biossensores impressos em papel, em particular, são uma ferramenta que pode vir a ser muito útil na construção destes testes rápidos tornando-os mais “amigos do ambiente” e reduzindo os seus custos.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver biossensores enzimáticos, de segunda geração, impressos em papel e baseados na enzima glucose oxidase, para a detecção da glucose. Inicialmente foi feito um estudo de possíveis mediadores a utilizar, tendo-se escolhido o ferroceno por apresentar um limite de detecção adequado, ter apresentado um valor de potencial de redução relativamente baixo, 0.232 V vs pseudo ref. Ag/AgCl, ser um composto fácil de obter e com custos reduzidos.

Os dispositivos baseiam-se em canais microfluídicos, eléctrodos e ligações eléctricas fabricadas em substrato de papel, utilizando as técnicas de *impressão a cera*, *screen printing* e *inkjet printing*. O circuito constituinte destes dispositivos foi feito recorrendo a tintas condutoras, sendo que, à tinta utilizada para o eléctrodo de trabalho foi incorporado o ferroceno. Sobre o eléctrodo de trabalho foi impressa glucose oxidase, utilizando a técnica de *inkjet printing*. Os eléctrodos fabricados apresentaram resposta à glucose, muito embora com baixa reprodutibilidade, podendo esta ser causada pela falta de controlo na preparação dos mesmos (manufatura manual e variabilidade da viscosidade da pasta usada no eléctrodo de trabalho). A técnica de *inkjet printing* em enzimas é ainda muito recente, existindo ainda alguns aspectos, como o seu efeito na actividade da enzima, que não foram avaliados neste projecto, mas que no futuro deverão ser estudados. Podemos concluir que, os eléctrodos deram uma resposta electroquímica consistente à adição de glucose, 8 mM- 30 mM, sendo que os mesmos foram reconhecidos no glucómetro comercial *TRUETrack™ blood glucometer*; no entanto, os valores de corrente dos dispositivos estavam abaixo do limite de detecção do instrumento.

Palavras-chave: POCT, eléctrodos de papel, biossensores enzimáticos, glucose, *inkjet printing*

In a world of constant development it becomes imperative to improve global healthcare tools. An extremely important factor for disease prevention and treatment is the capability to diagnose correctly. Since not all countries have high economical power, it becomes vital to develop quick and cheap tests that can be used all over the world. Point-of care tests, such as glucose biosensors, vastly used for diabetes monitoring, offer a solution for this problem. Paper based biosensors are, in particular, a tool that can prove to be very useful in the construction of these rapid tests making them more environmentally friendly and reducing their costs.

This project aims to develop second-generation, paper-based, biosensors, based on the enzyme glucose oxidase for glucose detection. An initial study was performed to identify possible mediators having chosen ferrocene due to its adequate detection limit, a low reduction potential (0,232 vs pseudo ref. Ag/AgCl), of easy access and low cost price.

The devices are based on microfluidics channels, electrodes and electric interconnections fabricated on a paper substrate. These require the use of wax printing, screen printing and inkjet printing. The circuit of the devices was made with conductive ink, being that the working electrode was made by incorporating ferrocene into the conductive paste. Glucose oxidase was printed on top of the working electrodes trough inkjet printing. This electrode configuration responded to glucose, although it presented low reproducibility which in itself may be related to the lack of a standard preparation method (manual manufacturing and viscosity variations on the electrode). Inkjet printing of enzymes is a very recent technique with some aspects, like the activity of GOx after printing, that haven't been studied here but should be in the future. Even with these limitations, the electrodes gave a good electrochemical response to glucose addition (8 mM-30 mM), having also been recognized by the TRUETrack™ blood glucomete.,however, the current values for the devices were bellow the instrument detection threshold.

Keywords: POCT, paper base electrode, enzymatic biosensor, glucose, inkjet printing

Índice

| | |
|---|-----|
| Agradecimentos | vii |
| Resumo | ix |
| Abstract | xi |
| Lista de figuras | xv |
| Siglas, Acrónimos e Abreviaturas | xix |
| Lista de símbolos | xxi |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. <i>Point of care testing</i> | 1 |
| 1.2. Técnicas de impressão | 2 |
| 1.2.1 Inkjet printing | 2 |
| 1.2.2 Screen printing | 3 |
| 1.3. Biossensores | 4 |
| 1.3.1. Biossensores electroquímicos..... | 6 |
| 1.3.2 Biossensores amperométricos | 8 |
| 1.3.3 Mediadores redox..... | 9 |
| 1.3.4 Biossensores impressos em papel..... | 10 |
| 1.4. Métodos de diagnóstico de glucose | 11 |
| 1.4.1. A glucose e a diabetes mellitus..... | 11 |
| 1.4.2 Monitorização da glucose..... | 12 |
| 1.4.3 Enzimas com acção catalítica para a glucose | 13 |
| 2. Materiais e Métodos Experimentais..... | 15 |
| 2.1. Materiais e Reagentes | 15 |
| 2.2. Métodos experimentais..... | 16 |
| 2.2.1 Ensaio Electroquímico | 16 |
| 2.2.2 Preparação do eléctrodo de trabalho..... | 19 |
| 2.2.3 Fabrico dos dispositivos em papel | 20 |
| 2.2.4 Impressão a cera..... | 21 |
| 2.2.5 Impressora de jacto de tinta | 22 |
| 2.2.6 Solução para impressão do componente biológico do biossensor..... | 23 |
| 3. Apresentação e Discussão de Resultados | 25 |
| 3.1. Selecção do mediador redox - ensaios em solução..... | 25 |
| 3.2. Incorporação dos mediadores redox em pasta de carbono | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Eléctrodos de papel | 32 |
| 3.3.1 Incorporação do mediador nos eléctrodos de papel | 34 |
| 3.3.2 Aplicação da GOx no eléctrodo de trabalho..... | 37 |
| 3.3.3 Comparação com eléctrodos comerciais | 41 |
| 4. Conclusões e Perspectivas Futuras | 43 |
| Bibliografia | 45 |
| Anexos..... | i |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1-1. Exemplos de POCT existentes no mercado: A) Detecção de glucose; B) Testes de toxicologia; | 1 |
| Figura 1-2- Esquema de impressão, adaptado de ¹⁰ | 3 |
| Figura 1-3- Representação esquemática do processo de <i>screen printed</i> ¹⁷ | 4 |
| Figura 1-4. Exemplos de componentes dos biossensores (adaptado de ²⁵) | 6 |
| Figura 1-5- Esquema das várias gerações de biossensores: A) 1ª geração; B) 2ª geração; C) 3ª geração | 7 |
| Figura 1-6. Esquema reacional do mediador com a glucose oxidase (adaptado de ³¹) | 9 |
| Figura 1-7. Molécula de glucose | 11 |
| Figura 1-8- Testes electroquímicos para detecção da glucose, disponíveis no mercado Da esquerda: ACCUCHEK AVIVA, TRUE TRACK, PRECISION XTRA, FREESTYLE LITE, ASCENSIA COUNTER, NOVA, ARKRAY, ONE TOUCH ULTRA, AGAMATRIX | 12 |
| Figura 1-9- representação da reacção da glucose oxidase ³⁷ | 13 |
| Figura 2-1- Potenciostato Autolab PSTAT 12 | 16 |
| Figura 2-2-Variação do potencial aplicado em função do tempo numa experiência de voltametria cíclica (adaptado ⁴¹) | 18 |
| Figura 2-3. Voltamograma Cíclico (VC) | 18 |
| Figura 2-4. Representação esquemática do funcionamento da pipeta microman | 20 |
| Figura 2-5. A) estufa química; B) banho de ultra-sons | 20 |
| Figura 2-6 A) Padrão a cera ; B) Máscaras obtidas por corte a laser ; C) desenho representativo do dispositivo final..... | 21 |
| Figura 2-7. Visão esquemática de uma impressora de tinta sólida (adaptado de ⁴³) | 22 |
| Figura 2-8. cabeça de impressão de uma impressora Canon | 22 |
| Figura 3-1-A) voltamograma cíclico do ferricianeto de potássio em 1 M KCl pH 7,6; B) voltamograma cíclico do ferricianeto de potássio em 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 6,5, velocidade de varrimento 50mV/s..... | 26 |
| Figura 3-2- Voltamogramas cíclicos de iodeto de ferrocenometil trimetilamônio em 0,1M fosfato de sódio pH 6,5, na presença de várias concentrações de glucose (0-55 mM), velocidade de varrimento 35 mV. | 27 |
| Figura 3-3. A) Ácido ferrocenocarboxílico 0,5 mM em 50 mM Tris pH 7,6, 0,1 M KCl, 123U GOx, na presença de concentrações crescentes de glucose, velocidade de | |

| | |
|---|----|
| varrimento 10mV/S. B) Recta de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose($y = 0,86448x - 0,73351$; $r^2=0,99$) | 28 |
| Figura 3-4. Voltamograma cíclico de um compósito de 5 mg de ferroceno incorporado em 21 μ L tinta de carbono/MEK, (- - -) primeiro ciclo; (—) ciclos nº 60, electrólito suporte 50 mM Tris ,0,1 M KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50mV/s | 29 |
| Figura 3-5- - Voltamograma cíclico de um compósito de 5 mg de 1'1 dimetilferroceno incorporado em 21 μ L de pasta de carbono/MEK, (- - -) primeiro ciclo; (—) ciclos nº 50, electrólito suporte 50 mM Tris , 0,1 M KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 35 mV/s..... | 30 |
| Figura 3-6. Voltamograma cíclico de um compósito de 2.7 mg ácido ferrocenocarboxílico incorporado 21 μ L tinta de carbono, (- - -) primeiro ciclo; (—) ciclos = 50, electrólito suporte 50 mM Tris , 0,1 M KCl, pH 7,6 , velocidade de varrimento 50mV/s | 30 |
| Figura 3-7- A) Voltamograma cíclico do ferroceno/pasta de carbono de carbono, <i>overnight</i> em estufa a 60 °C, na presença de 123 U de GOx e várias concentrações de glucose(0-9 mM), velocidade de varrimento 50mV/s B) curva de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose ($y = 0,175x - 0,4219$; $r^2=0,995$) | 32 |
| Figura 3-8. Diagrama esquemático do dispositivo feito em papel, adaptado de ⁴⁸ , A=14mm; B=4mm; C=1,2mm; D=4mm; E=1,5 mm | 33 |
| Figura 3-9-Voltamograma Cíclico de 0,0,55 mM ácido ferroceno carboxílico em 50 mM Tris 0,1 M kCl pH 7,6 em tira de papel cujos eléctrodos eram de carbono, velocidade de varrimento 50 mV/s..... | 33 |
| Figura 3-10. Voltamogramas Cíclicos de 0,5 mM ácido ferrocenocarboxílico em 50 mM Tris pH 7,6 , 0,1 M kCl pH 7,6 de diferentes fitas de papel compreendendo um sistema de 3 eléctrodos impressos com tinta de carbono, sinal medido após 1 minuto da deposição de uma gota de 3 μ L da solução contendo o mediador. | 34 |
| Figura 3-11- Eléctrodos impressos em papel, contendo ferroceno | 35 |
| Figura 3-12. Voltamograma Cíclico do ferroceno/pasta de carbono no eléctrodo de trabalho após adição de solução 50 mM Tris 0,1 M kCl pH 7,6. | 35 |
| Figura 3-13. Voltamograma Cíclico de eléctrodos de papel contendo ferroceno no electrodo de trabalho, após adição de uma gota de 3 μ L da solução 50 mM Tris 0,1 M kCl pH 7,6. | 36 |
| Figura 3-14. Variação do sinal voltamétrico ao longo do tempo (5minutos). Foi depositada uma gota de 3 μ L de solução 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 7,6 numa fita de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho, velocidade de varrimento 50mV/s..... | 37 |
| Figura 3-15. Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho e enzima no substrato, com concentrações crescentes de glucose, em electrólito suporte 50 mM 0,1 Tris KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50 mV/S | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 3-16 Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho e enzima impressa no electrodo de trabalho, com concentrações crescentes de glucose, em electrólito suporte 50mM 0,1 Tris KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50mV/S | 40 |
| Figura 3-17. Recta de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose ($y = 0,0105x - 0,0369$; $r^2=0,98$) | 40 |
| Figura 3-18 Comparação entre o sinal voltamétrico de : A) Eléctrodos comerciais e B) Eléctrodos em papel | 41 |

Siglas, Acrónimos e Abreviaturas

CENIMAT - Centro de Investigação de Materiais

Fc - Ferroceno

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

GPES - General Purpose Electrochemical System

GOx – Glucose oxidase

IUPAC- *International Union of Pure and Applied Chemistry*

PBS - *Phosphate buffered saline*

PET - Politereftalo de etileno

POCT - *Point of care testing*

PQQ-GDH - Pirroloquinolina quinona glucose desidrogenases

PTFE - Politetrafluoretileno

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UNL – Universidade Nova de Lisboa

VC- Voltametria cíclica

μL – Microlitro

μA – Microampere

Ag/AgCl - Prata Cloreto de Prata

cP - Centipoise (um milipascal segundo)

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

dyn/cm – dyne por centímetro

DPI - *Dots per inch*

D - *Droplet*

E – Potencial

E^0 – Potencial formal de redução

E_p – Potencial no pico

E_{pa} – Potencial do pico anódico

E_{pc} – Potencial do pico catódico

ΔE – Separação entre os potenciais de pico

I_a – Intensidade de corrente do pico anódico

I_c – Intensidade de corrente do pico catódico

KCl – Cloreto de potássio

MEK - Metil etil cetona

mL - Mililitro

mM – Milimolar (milimole / Litro)

M – Molar

p / v – Peso por volume

U - Unidades

V – Volt

η – Viscosidade

σ – Tensão superficial

1. Introdução

1.1. *Point of care testing*

Point of care testing (POCT) pode ser descrito como “ testes realizados junto ao paciente”, ou seja, regra geral, os testes são realizados perto do paciente, seja à cabeceira da cama, no escritório do médico, sala de emergência, unidade de terapia intensiva, sala de cirurgia ou onde quer que seja necessário assistência médica, sem a necessidade do equipamento sofisticado existente apenas em laboratórios centrais. O principal objectivo do POCT é minimizar o intervalo de tempo entre os testes de diagnóstico e o tratamento.¹ Estes dispositivos acrescentam outras vantagens para além das mencionadas anteriormente, como baixo custo, versatilidade, e facilidade de uso.² Estes instrumentos combinam múltiplas funções analíticas em dispositivos portáteis que podem ser utilizados tanto por pessoa especializadas como pelos próprios doentes. Isto leva a que seja fundamental o controlo de qualidade e a preparação dos mesmos.³

O POCT permite realizar inúmeros testes clínicos entre eles testes de toxicologia, de gravidez, à urina e análise de glucose, Figura 1-1, podendo também ser aplicado para o controlo de qualidade de alimentos, monitorização ambiental, industrial e em ciências forenses.^{4,5}



Figura 1-1. Exemplos de POCT existentes no mercado: A) Detecção de glucose; B) Testes de toxicologia;

A utilização do POCT é particularmente importante no caso dos países em desenvolvimento, onde é frequente não haver a possibilidade de suportar os custos de infraestruturas especializadas e de testes relativamente caros. O primeiro passo na prevenção e tratamento adequado da doença é o diagnóstico clínico, mas as tecnologias de diagnóstico utilizadas no mundo economicamente desenvolvido podem não ser viáveis nos países em vias de desenvolvimento. Há, portanto, a necessidade de desenvolver dispositivos de baixo custo e que não necessitem de pessoal especializado, por forma a que os cuidados de saúde sejam garantidos, ou melhorados, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento.⁶

Esta crescente demanda por POCT é um desafio que poderá ser cumprido através da utilização de sensores baseados em papel. Estes são uma nova classe de dispositivos de diagnóstico de *point-of-care* desenhados principalmente para uso em países em desenvolvimento.^{6,7}

A crescente evolução de técnicas de impressão como o *screen printing* e *inkjet printing* irão permitir uma produção em larga escala e de forma mais económica destes dispositivos.

1.2. Técnicas de impressão

A sociedade está em constante estado de crescimento e é inevitável que a procura por dispositivos de detecção relacionados com aplicações clínicas e industriais venha a aumentar. A fim de alcançar este objectivo, dispositivos baratos e descartáveis, mas altamente precisos rápidos são muito procurados.⁸

Técnicas de impressão de eléctrodos e enzimas como o *screen printing* ou o *inkjet printing* são de elevada importância para atingir os objectivos descritos.

1.2.1 *Inkjet printing*

Inkjet printing (impressão a jacto de tinta), é uma técnica versátil que descreve o uso de atuadores eléctricos para ejectar volumes na dimensão dos picolitros a partir de micro orifícios, num substrato com um padrão definido, Figura 1-2. Apesar desta técnica de impressão ser mais conhecida pela impressão de documentos em papel, tem vindo a ser utilizada também em campos tão diversos como a electrónica orgânica, síntese química, fabrico de sensores entre outros.⁹

O *inkjet printing* pode ser dividido em duas categorias: a deposição por jacto contínuo ou a deposição gota a gota. Pode ainda ser dividida de acordo com os meios específicos de geração de gotículas tal como piezoeléctrico, térmico e electrostático. No primeiro caso, um elemento piezoeléctrico de cerâmica no injector flexa para o reservatório de tinta na cabeça de

impressão, forçando a gota a sair. No processo de jacto de tinta térmico, os cartuchos de tinta contêm uma série de pequenas câmaras, cada uma contendo um aquecedor. Para ejectar uma gotícula a partir de cada uma das câmaras, um pulso de corrente passa através do elemento de aquecimento, causando uma rápida vaporização da tinta na câmara de modo a formar uma bolha, o que provoca um grande aumento de pressão, impelindo uma gotícula de tinta sobre o papel. No último caso, o *nozzle* produz um fino feixe de gotas de tinta minúsculas que são submetidas a uma carga electrostática. Uma vez carregadas, as gotas podem ser direccionadas, usando placas carregadas. Como o esperado, cada uma destas técnicas tem os seus pontos fortes e limitações no que toca à impressão de soluções biológicas. As limitações podem ser causadas pela gama de temperatura de operação, reprodutibilidade das gotas, precisão da deposição, gama de viscosidade para impressão, volume do reservatório, número de fluídos que pode ser impresso durante uma única experiência.^{9,10,11,12}

Entre as inúmeras vantagens da impressão a jacto destacam-se: a facilidade no seu uso, os preços razoáveis, ser muito mais preciso que a deposição manual, utiliza quantidades de líquido na ordem de grandeza dos picolitros e reduz nos riscos de contaminação.⁹

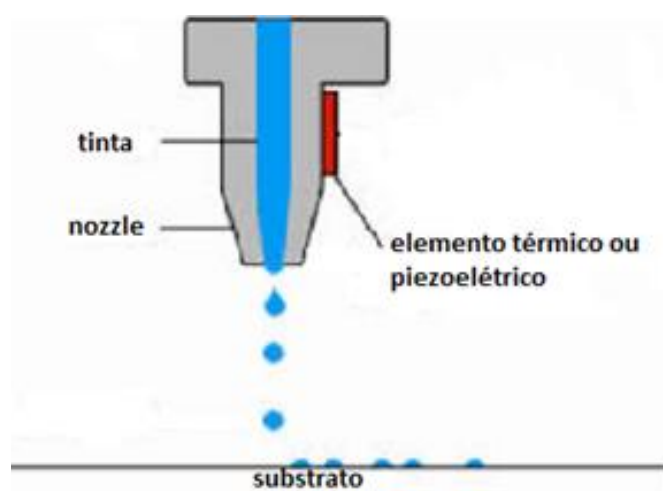


Figura 1-2- Esquema de impressão, adaptado de ¹⁰

1.2.2 Screen printing

A técnica de *screen printing* é amplamente utilizada para o fabrico em grande escala de biossensores descartáveis, trazendo várias vantagens, incluindo um preço baixo e versatilidade em formato e tamanho.¹³ O processo de “screen-printing” consiste basicamente em forçar a tinta a passar através de uma tela para ser depositada sobre um substrato plano. O desenho definido pelas partes abertas da tela é reproduzido no substrato, Figura 1-3. Uma combinação

do uso sucessivo de diferentes telas e diferentes tintas é normalmente utilizada na preparação dos eléctrodos.¹⁴

Os eléctrodos impressos permitiram a produção de sensores modernos que podem ser incorporados em sistemas portáteis, um requisito importante dos métodos analíticos para a análise directa de uma amostra (POCT). A recente possibilidade de concepção e fabrico de eléctrodos *screen printed*, incluindo microeléctrodos, eléctrodos modificados quimicamente, etc., e incorporar estes numa variedade de biossensores de alta sensibilidade aumentou o interesse industrial, clínico e ambiental neste campo.¹⁵

A tecnologia *screen-printing* é especialmente recomendada como um método simples e rápido para uma produção em larga escala de eléctrodos amperométricos.¹⁶

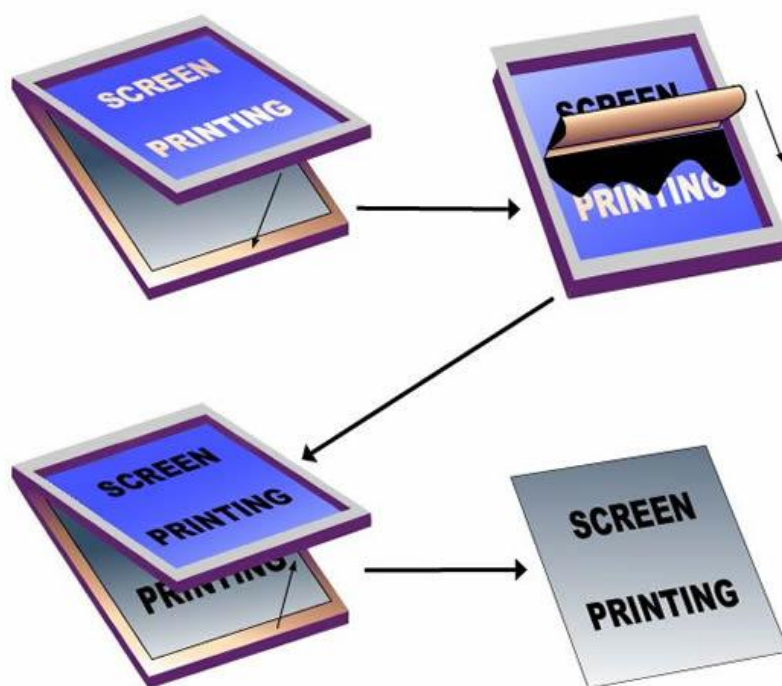


Figura 1-3- Representação esquemática do processo de *screen printed*¹⁷

1.3. Biossensores

A definição de biossensores mais amplamente aceite é a de um dispositivo analítico integrado que incorpora um material biológico activo (enzimas, proteínas, anti-corpos, ácidos nucleicos) em contacto com um elemento de transdução apropriado, para a detecção da concentração de espécies químicas, em qualquer tipo de amostra¹⁸. Por conseguinte, existem três componentes principais num biossensor: os *elementos de reconhecimento biológico*, que

diferenciam as moléculas alvo na presença de vários químicos, *um transdutor*, que converte o evento de bioreconhecimento num sinal mensurável e *um sistema* de processamento, este último convertendo o sinal numa forma legível.^{5,19} De acordo com as recomendações do IUPAC, instrumentos analíticos que não incorporem um elemento sensor biológico não podem ser considerados biossensores, mesmo quando são aplicados para a análise de amostras biológicas. Além do mais, um biossensor deve ser um dispositivo que não necessita de adição de reagentes.²⁰

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento de bioreconhecimento, o modo de transdução do sinal ou a combinação dos dois. Os biossensores podem ainda ser agrupados de acordo com o tipo de substância alvo a analisar.²¹

Na classe dos biossensores catalíticos além das enzimas purificadas, qualquer organelo celular, célula inteira ou 'fatias' de tecido que exibam actividade catalítica podem ser usados como elemento de bioreconhecimento. Os sensores de afinidade incluem todos os sistemas de detecção baseados na formação de um complexo estável entre o componente biológico e as espécies de analitos.²¹

A mudança físico-química resultante da interacção do material biologicamente ativo com o analito deve ser convertida por um transdutor apropriado num sinal elétrico de saída. Os biossensores podem, de acordo com o transdutor, enquadrar-se em biossensores electroquímicos, que por sua vez, consoante os processos electroquímicos, podem ser divididos em: potenciométricos, voltamétricos ou condutométricos. Existem também biossensores fotométricos ou fluorimétricos, quando envolve alterações nas propriedades fotométricas; podem ainda ser usados transdutores que dão a indicação da variação da entalpia da reação (térmica), alterações de massa (cristal piezoelétrico), ou a espessura da camada (reflectometria).²²

A indicação eletroquímica prevalece sobre todos os outros métodos de transdução. Eléktrodos enzimáticos amperométricos e potenciométricos estão na liderança da tecnologia de biossensores no que respeita a literatura científica, assim como a dispositivos disponíveis comercialmente. Estes são os biossensores mais utilizados devido ao seu reduzido custo, fácil utilização, portabilidade e simplicidade de construção.⁵

Estes dispositivos podem também ser classificados de acordo com a sua configuração. Podem ser de uso único, quando são incapazes de monitorizar a concentração do analito ao longo do tempo contêm os elementos de seletividade e os elementos de transdução num sistema completo que normalmente não é activado até que a amostra seja aplicada.²³ São denominados sensores de uso intermitente quando podem ser rápido e reprodutivelmente regenerados após cada ensaio podendo ser usados durante meses, dependendo do sistema de biossensibilidade. Por último, temos os sensores de uso contínuo; estes são semelhantes aos anteriores, sendo a grande diferença o facto de o sensor estar mergulhado na amostra, indicando continuamente as leituras que reflectem a concentração do analito em função do tempo.²¹

Consoante o nível de rigor, os biossensores podem fornecer uma análise qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa.²⁴

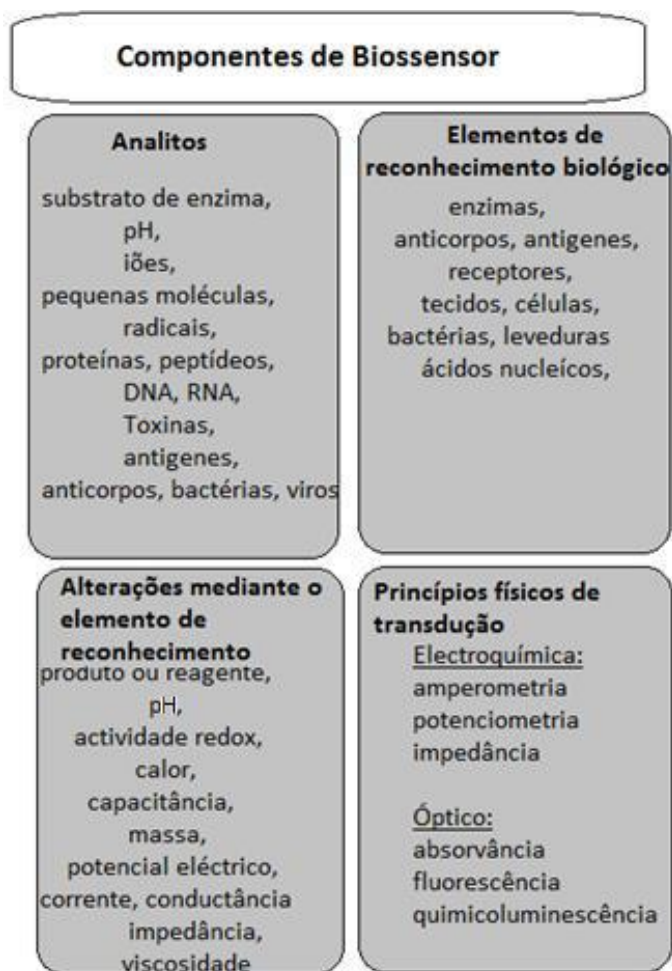


Figura 1-4. Exemplos de componentes dos biossensores (adaptado de²⁵)

1.3.1. Biossensores electroquímicos

Os biossensores electroquímicos combinam a sensibilidade dos métodos electroanalíticos com a selectividade inerente do componente biológico.

De acordo com o seu nível de integração, os biossensores descritos na literatura podem ser subdivididos em três gerações (Figura 1-5).

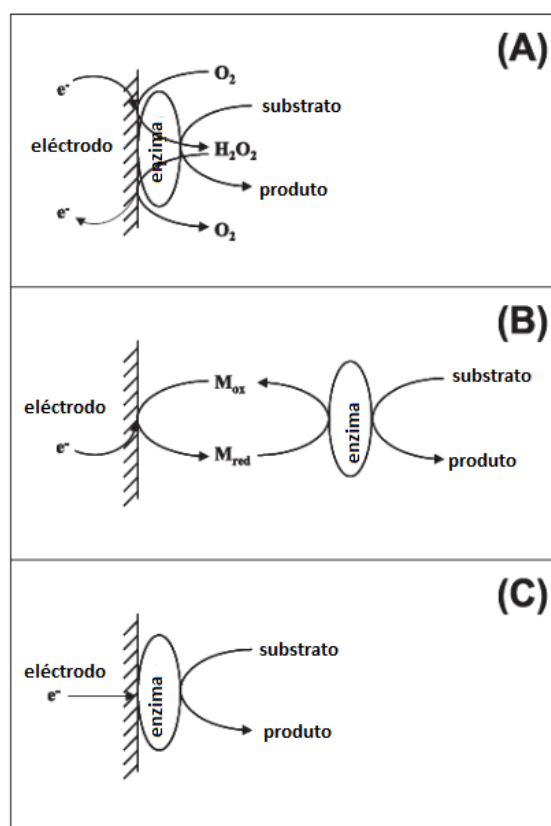


Figura 1-5- Esquema das várias gerações de biossensores: A) 1ª geração; B) 2ª geração; C) 3ª geração

A abordagem mais simples para a construção de biossensores amperométricos baseados em oxidoreductases envolve a monitorização de correntes produzidas pela oxidação ou redução do co-substrato natural, livremente difundido, por exemplo O_2 , na presença do substrato da enzima.²¹ A equação 1 representa numa forma genérica a reacção catalisada por oxidases; o substrato pode ser glucose, lactato, colesterol, etanol, entre outros. Os co-substratos O_2 e H_2O_2 representam as espécies electroactivas.²⁶

Oxidase



Esta abordagem faz referência aos sensores de 1ª geração.

Os sensores utilizados neste trabalho são os de segunda geração e por isso apenas iremos citar o funcionamento destes. Nestes sensores incorpora-se um mediador redox artificial (moléculas que podem transferir os electrões entre os centros redox da enzima e o eléctrodo), o qual deve reagir com a oxidase reduzida muito rapidamente durante o ciclo catalítico. Os mediadores redox devem, não só, ser capazes de competir com o oxigénio difuso livremente mas, como alternativa, aceitar os electrões de oxidases

Tal como foi referido, a detecção electroquímica pode ser realizada por amperometria, potenciometria ou condutometria (Tabela 1):

Tabela 1- Tipos de detecção electroquímica (adaptado de²⁵)

| Tipo de medição | Transdutor | Analito |
|-----------------|---|---|
| Potenciometria | Eléctrodo de selectividade ionica (ISE) Eléctrodo de vidro Eléctrodo de gás Eléctrodo de metal | K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , F^- H^+ , Na^+ ... CO_2 , NH_3 espécies redox |
| Amperometria | Eléctrodo de metal ou carbono Eléctrodos modificados quimicamente (CME) | O_2 , açúcares, álcoois... Açúcares, álcoois, fenóis, oligonucleotidos |
| Condutometria | Eléctrodo interdigitados, Eléctrodo de metal | Ureia, espécies carregadas, oligonucleotidos |

Dos três tipos de detecção electroquímica a amperometria é a mais relevante para o projecto a desenvolver.

A amperometria é baseada na medição das correntes resultantes da oxidação ou redução electroquímica de uma espécie electroactiva. É geralmente realizada mantendo um potencial constante num eléctrodo de trabalho de carbono, ouro ou platina. A corrente resultante está directamente relacionada com a concentração em massa das espécies electroactivas ou com a sua taxa de consumo ou produção na camada biocatalítica adjacente.²⁷

1.3.2 Biossensores amperométricos

Biossensores amperométricos são bastante sensíveis e mais adequados para a produção em massa do que os potenciométricos. Podem ser utilizadas configurações de dois ou três eléctrodos. O primeiro caso consiste num eléctrodo de referência e num de trabalho, no qual o componente de bioreconhecimento se encontra imobilizado. A principal desvantagem desta configuração de dois eléctrodos é um controlo limitado do potencial sobre a superfície do eléctrodo de trabalho para correntes mais elevadas, e por isso, a gama de linearidade poderá ser diminuída. Para resolver este problema é empregue um eléctrodo auxiliar. Desta forma a tensão é aplicada entre o eléctrodo de referência e o de trabalho, e a corrente flui entre o eléctrodo de trabalho e o auxiliar.²⁸

O maior problema dos biossensores baseados em enzimas da família das oxidases é a sua dependência de concentração de oxigénio dissolvido. Isto pode ser ultrapassado através da utilização de mediadores que transferem os electrões directamente para o eléctrodo ao invés da

redução do co-substrato oxigénio. Na secção 1.3.3 alguns parâmetros sobre mediadores redox são discutidos.

No projecto que se pretende desenvolver irá utilizar-se, como referido anteriormente, a amperometria como plataforma de transdução, acoplada a enzimas redox para detecção dos seus substratos(analitos).

A análise de resultados obtidos pelos biossensores amperométricos será efectuada utilizando duas técnicas electroquímicas: Voltametria cíclica e amperometria. A descrição destas técnicas poderá ser encontrada na secção 2.2.1 .

1.3.3 Mediadores redox

Em circunstâncias normais, a transferência de electrões entre o local ativo da glucose oxidase reduzida e um eléctrodo sólido ocorre muito lentamente ou não acontece de todo. A ausência desta transferência deve-se à distância entre o local ativo da enzima e o eléctrodo ser demasiado grande para os electrões a atravessarem. Contudo a transferência electrónica pode ser facilitada se for utilizado um pequeno receptor/dador de electrões como mediador.

Existem vários mediadores electrónicos, porém os ferrocenos são particularmente úteis, encontrando um amplo uso nos biossensores baseados na glucose oxidase. Os ferrocenos, na sua forma reduzida, são insolúveis em soluções aquosas e, por conseguinte, podem ser adsorvidos sobre a superfície do eléctrodo. Na reação o mediador é oxidado pelo eléctrodo e torna-se mais solúvel, desta maneira pode afastar-se do eléctrodo e reagir com a glucose oxidase reduzida. Tendo sido reduzido pode ser readsorvido para a superfície do eléctrodo onde é então reoxidado, Figura 1-6. Desta forma os electrões da glucose oxidase são transferidos para o eléctrodo.

Estes compostos permitem aos biossensores funcionar a potenciais relativamente baixos, e isto pode levar a uma diminuição da interferência electroactiva de componentes como a vitamina C ou o ácido úrico que podem estar presentes nos fluídos fisiológicos.^{29,30}

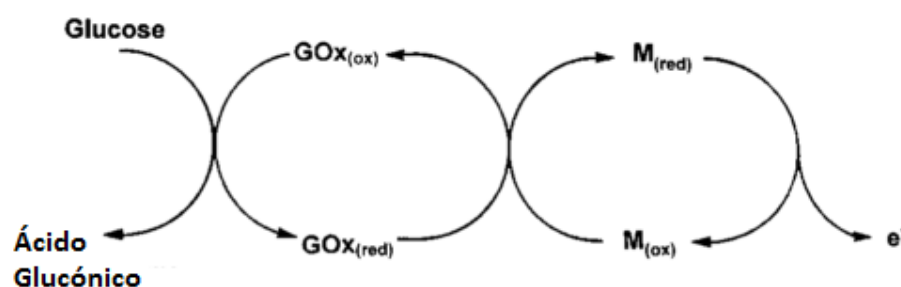


Figura 1-6. Esquema reacional do mediador com a glucose oxidase (adaptado de ³¹)

1.3.4 Biossensores impressos em papel

Os biossensores impressos em papel são uma nova alternativa tecnológica para o fabrico simples, amigo do ambiente, de baixo custo, portátil e descartável de dispositivos analíticos para muitas áreas de aplicação incluindo o diagnóstico clínico, o controlo de qualidade e a monitorização ambiental.

O papel é um material bastante conhecido e abundante. Porém, as suas potencialidades vão para além da utilização na escrita, impressão, desenho ou empacotamento. Este material apresenta propriedades físicas que podem ser muito úteis na construção de biossensores electroquímicos.⁷ Este têm vindo a ser utilizados ao longo de décadas como uma plataforma para química analítica, podendo, portanto, tirar proveito de técnicas analíticas já existentes.⁶

O principal constituinte do papel é a fibra de celulose que permite que os líquidos penetrem na sua matriz de fibra hidrófila, sem ser necessário a utilização de uma bomba activa ou de uma fonte externa.⁷

Existem diversas características que fazem do papel uma opção bastante apelativa na produção de biossensores. Exemplos disso são: pode ser modificado quimicamente para incorporar uma ampla variedade de grupos funcionais que podem ser ligados covalentemente a proteínas, DNA ou pequenas moléculas; apresenta habitualmente uma cor branca, sendo um bom material de suporte para testes colorimétricos, pois proporciona um bom contraste com o substrato de cor; a celulose é compatível com amostras biológicas; o papel é inflamável, por isso os dispositivos feitos deste material podem ser facilmente eliminados por incineração e com segurança após o seu uso; é bastante flexível e compatível com várias tecnologias de impressão existentes, facilitando fabrico de biossensores; está disponível numa grande variedade de formas altamente modificadas com uma gama muito ampla de propriedades.⁶

Existe uma variedade de materiais de papel disponíveis para o fabrico de POCT. A escolha do mais apropriado baseia-se essencialmente nas etapas de fabrico necessárias para o desenvolvimento do dispositivo e na área de aplicação deste. No desenvolvimento de sensores e tecnologias de microfluídos, o papel de filtro foi o material mais utilizado nos últimos anos para a produção de sensores à base de papel, devido à sua capacidade de absorção. Apesar do papel de filtro ser o material mais utilizado no fabrico de biossensores impressos em papel, existem outros tipos de papel que podem também ser utilizados; um exemplo disso é papel brilhante (papel de fotografia).⁶

O fluxo de líquidos através do papel pode ser estudado e trabalhado utilizando uma ciência denominada microfluídica. Esta ciência lida com o fluxo de líquidos com volumes na ordem dos nano ou microlitros em canais de tamanhos na escala dos micrómetros. Informação mais detalhada sobre estes processos encontra-se nos anexos A.1.

1.4. Métodos de diagnóstico de glucose

1.4.1. A glucose e a diabetes mellitus

A glucose é um hidrato de carbono simples (monossacarídeo), sendo o açúcar mais importante no metabolismo humano. É uma das principais moléculas que servem como fonte de energia para plantas e animais. Quando totalmente oxidada no corpo, a glucose produz dióxido de carbono, água e, no processo, fornece energia que pode ser utilizada pelas células.

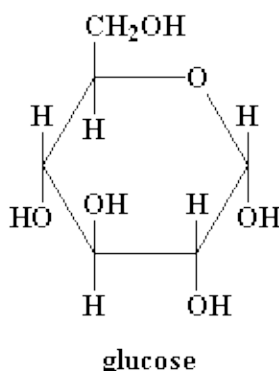


Figura 1-7. Molécula de glucose

O valor médio de glucose no sangue em humanos é de 72 mg/dL, 4 mM. Porém, ao longo do dia, estes valores variam, apresentando valores mais baixos, geralmente, de manhã e em jejum (entre 70 e 130 mg/dL), ou mais elevados após as refeições, sendo o valor saudável inferior a 180 mg/dL. Valores anormais da concentração de glucose no sangue podem ser indicativos da alteração do estado de saúde ou de alguma doença, como por exemplo a diabetes mellitus.³²

A diabetes é uma doença crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina ou quando o organismo não consegue utilizar a insulina produzida. A insulina é uma hormona que permite a regulação da concentração de açúcar no sangue. A ausência de insulina ou incapacidade de a utilizar pode levar ao desenvolvimento de uma série de problemas de saúde incapacitantes e fatais. Concentrações elevadas de glucose no sangue podem levar a doenças que afectam o coração e os vasos sanguíneos, os olhos, os rins e os nervos. O risco de desenvolver infeções é também outro factor aumentado em diabéticos.³³

Apesar das razões para o desenvolvimento desta doença ainda não serem conhecidos, existem vários factores de risco que incluem a obesidade, a inactividade física, a velhice, a história familiar de diabetes, e as elevadas concentrações de glucose no sangue durante a gravidez.³³ Em 2013, 382 milhões de pessoas foram diagnosticadas com diabetes e, no mesmo ano, houve 5,1 milhões de mortes causadas por esta doença. Estima-se que existam 175 milhões de pessoas com diabetes que ainda não foram diagnosticadas.³³

1.4.2 Monitorização da glucose

Os níveis de glucose no sangue podem, actualmente, ser monitorizados usando diferentes tipos de dispositivos. Todos os testes de detecção da glucose, disponíveis comercialmente (electroenzimáticos ou colorimétricos), baseiam-se na quantificação da reacção de oxidação da glucose catalizada pela enzima oxidase glucose (GOx).

Os sensores colorimétricos disponíveis comercialmente utilizam uma segunda enzima a peroxidase e um par redox corante para gerar concentrações crómoformas proporcionais à concentração de peróxido de hidrogénio produzido.³⁴

Existem também vários métodos de espectroscopia para diagnóstico da glucose *in vivo*: espectroscopia fluorescente (Glucose oxidase e sensores fluorescentes baseados em O_2), espectroscopia de infravermelho, espectroscopia Raman, detecção polarimétrica de glucose.³⁴

Por várias razões, incluindo a precisão e a capacidade de medir volumes de sangue extremamente pequenos, os testes electroquímicos ganharam vantagem nos últimos anos; actualmente, compreendem a grande maioria dos testes de tiras presentes no mercado. A Figura 1-8 mostra-nos alguns dos testes electroquímicos para detecção da glucose, disponíveis no mercado.³⁵

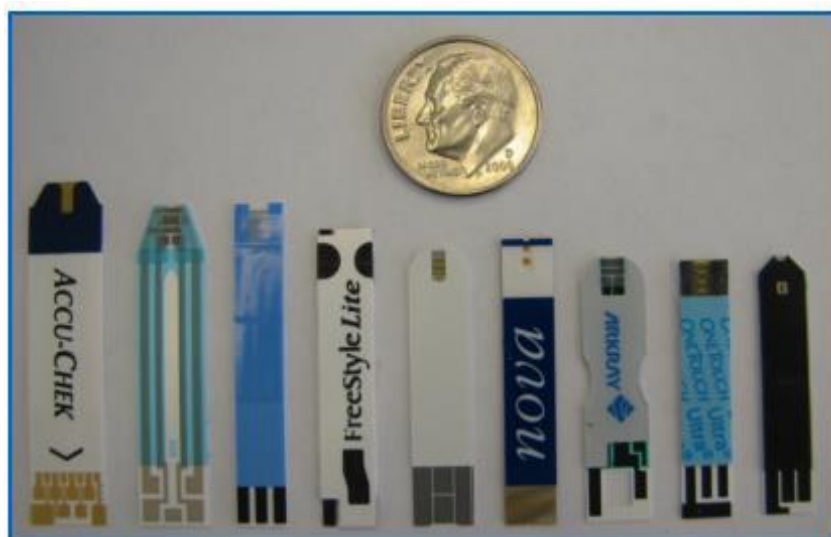


Figura 1-8- Testes electroquímicos para detecção da glucose, disponíveis no mercado Da esquerda: ACCUCHEK AVIVA, TRUE TRACK, PRECISION XTRA, FREESTYLE LITE, ASCENSIA COUNTER, NOVA, ARKRAY, ONE TOUCH ULTRA, AGAMATRIX

1.4.3 Enzimas com acção catalítica para a glucose

Existem duas famílias de enzimas que são mais comumente utilizadas na electrooxidação da glucose, as glucose oxidases (GOx)²³ e as pirroloquinolina quinona glucose desidrogenases (PQQ-GDH). As duas famílias diferem nos seus potenciais redox, na força das ligações entre as apoenzimas e os seus cofactores, nos seus co-substratos, nas suas constantes catalíticas, nas suas constantes de Michaelis (K_m), e na sua selectividade com a glucose.³⁶

O cofactor FAD da GOx é fortemente ligado à apo-GOx. A sua reacção com o oxigénio encontra-se em baixo desrita (Equação 2).



A glucose oxidase é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glucose em D-glucono- δ -lactona e peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , utilizando oxigénio molecular como receptor de electrões. As fontes microbiais mais comuns para a produção de glucose oxidase são *Aspergillus*, *Penicillium*, e as espécies *Saccharomyces*. A maior parte da glucose oxidase produzida comercialmente é isolada a partir do micélio de *Aspergillus niger*.³⁷ A GOx é relativamente selectiva para a glucose. Na reacção de oxidação na qual a glucose é oxidada pelo FAD-GOx, perto de 5000 moléculas de glucose são oxidadas por segundo.

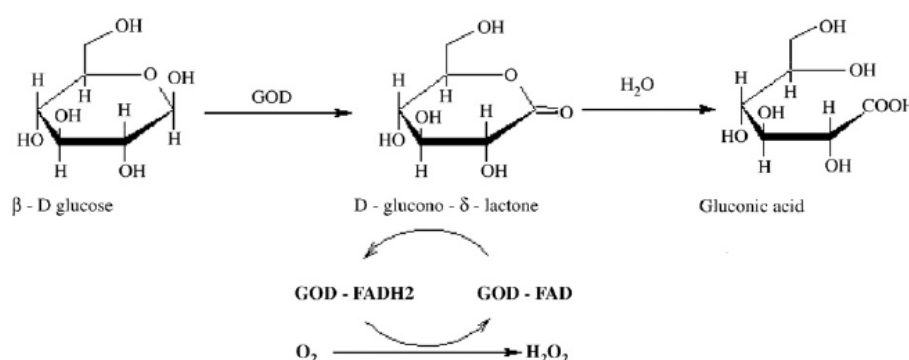


Figura 1-9- representação da reacção da glucose oxidase ³⁷

A actividade da enzima é dependente do estado de ionização dos aminoácidos no local activo, por isso o pH tem um importante papel na manutenção da estrutura apropriada de uma enzima. O pH óptimo da GOx varia entre 5,0 -7,0. Outro parâmetro que é bastante significativo

na actividade de uma enzima é a temperatura. Para uma gama de temperaturas entre 40 °C e 70 °C a maior parte das enzimas desnatura e perde a sua actividade. Para a glucose oxidase de *A. niger* a temperatura óptima situa-se entre 40-60 °C.

A GOx é a enzima mais amplamente utilizada como um reagente analítico para a determinação da glucose, devido ao seu custo relativamente baixo e à sua grande estabilidade.³⁷ Neste trabalho, pretende-se usar a GOx, a qual será impressa sobre o eléctrodo de trabalho utilizando a técnica de *inkjet printing*.

2. Materiais e Métodos Experimentais

2.1. Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados eram do maior grau de pureza disponível e estão disponíveis comercialmente. O 1'1- Dimetilferroceno (Alfa Aesar; $MW = 214,09 \text{ g.mol}^{-1}$), ácido ferrocenocarboxílico (Sigma-Aldrich; $MW = 230,04 \text{ g.mol}^{-1}$), iodeto de ferrocenometil trimetilamonio (Alfa Aesar; $MW = 385,06 \text{ g.mol}^{-1}$), Ferroceno (Sigma-Aldrich; $MW = 186,03 \text{ g.mol}^{-1}$), Ferricianeto, D-(+)- Glucose (Sigma-Aldrich; $MW = 180,16 \text{ g.mol}^{-1}$), glucose oxidase (Sigma-Aldrich; Aspergillus niger, 215 U.mg^{-1}), Triton[®]X-100 (oferta da Kemet), glicerol 99%(Sigma-Aldrich) , metil etil cetona 97% (Sigma-Aldrich), nafion (Sigma-Aldrich), teflón (PTFE), Foram utilizados papel Whatman nº 1, papel branco, tinta de prata cloreto de prata (Ag/AgCl), tinta resistiva de carbono, tinta condutora de prata, pasta condutora de carbono (etileno diacetato), todas as tintas foram adquiridas na Conductive Compounds, fita cola de dupla face e fita kapton.

Para a preparação da solução de enzima foi utilizado tampão fosfato 1 M, pH 6,5. As soluções de glucose utilizadas para os ensaios em solução foram feitas com água desionizada (Milli-Q). As soluções de glucose para os ensaios nas tiras de papel foram feitas utilizando como electrólito suporte, tampão 50 mM tris 0,1M KCl pH 7,6.

2.2. Métodos experimentais

2.2.1 Ensaios Electroquímicos

A escolha do mediador mais favorável para a construção dos biossensores de glucose, assim como a análise dos sensores em papel foram feitas através de ensaios de voltametria cíclica e amperometria. Para tal, foi utilizado um potenciostato AUTOLAB PSTAT 12 (um equipamento electrónico que funciona mantendo o potencial do eléctrodo de trabalho num valor constante relativamente ao eléctrodo de referência ajustando a corrente com um eléctrodo auxiliar), Figura 2-1. O *software* utilizado para a aquisição dos dados foi o GPES (*General Purpose Electrochemical System*). Usou-se um sistema de três eléctrodos composto por: eléctrodo de grafite pirolítica, eléctrodo de platina e eléctrodo de Ag/AgCl, numa célula de vidro. Os voltamogramas foram traçados com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s, salvo indicação contrária, e a janela de potencial variou consoante o mediador utilizado. Genericamente, usou-se um volume de electrólito suporte de 10 mL.



Figura 2-1- Potenciostato Autolab PSTAT 12

Nos sistemas electroquímicos, procura-se compreender os processos e factores que afectam o transporte de cargas ao longo da interface entre fases químicas, por exemplo, entre um conductor electrónico (eléctrodo) e um conductor iónico (electrólito).³⁸

Como foi referido, no trabalho a desenvolver irão utilizar-se como técnicas electroquímicas a voltametria cíclica, e amperometria.

- **Voltametria Cíclica**

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição de informação qualitativa sobre reações electroquímicas. A vantagem da voltametria cíclica resulta da capacidade de fornecer informação considerável sobre a termodinâmica de processos redox, na cinética de reações heterogéneas de transferência de electrões, e em reações químicas acopladas ou processos de adsorção. Em particular, oferece uma rápida localização dos potenciais redox das espécies electroactivas, e uma avaliação conveniente do efeito dos meios sobre o processo redox.³⁹

Para simplificar o processo electroquímico, vamos assumir que a solução electrolítica contém uma espécie electroactiva A que pode ser submetida a simples redução formando B.



No varrimento linear o potencial do eléctrodo de trabalho vai do valor V_1 em que A não pode sofrer redução, até ao potencial V_2 , onde a transferência de electrões acontece rapidamente. O potencial V aplicado é função da velocidade do varrimento do potencial (v_s) e do tempo de varrimento (t) (Equação 4).⁴⁰

$$V(t) = V_1 - v_s t \quad \text{Equação 4}$$

Na voltametria cíclica o varrimento linear voltamétrico pode ser alargado de modo que quando o potencial atinge o valor V_2 a direção é invertida e o potencial volta ao valor original, V_1 . Quando o potencial atinge V_2 é puxado para trás, oxidando as espécies B formadas no eléctrodo durante a redução de A. É verificada uma corrente no sentido oposto devido à oxidação de B para A. Esta corrente aumenta inicialmente porque existe uma elevada concentração de B na camada de difusão e a cinética para a conversão de B para A torna-se mais favorável quanto mais positivo for o potencial. Gradualmente, todo o B presente na camada de difusão é convertido em A e a corrente decresce para zero (Figura 2-2).⁴⁰

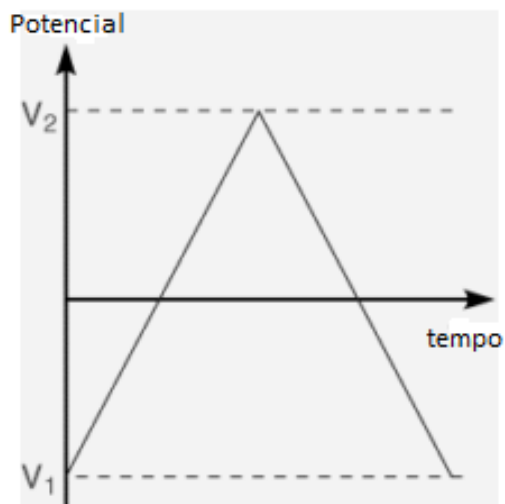


Figura 2-2-Variação do potencial aplicado em função do tempo numa experiência de voltametria cíclica (adaptado⁴¹)

Os parâmetros mais importantes num voltamograma cíclico são o pico de potencial, E_p , e os picos de corrente, i_p (Figura 2-3).

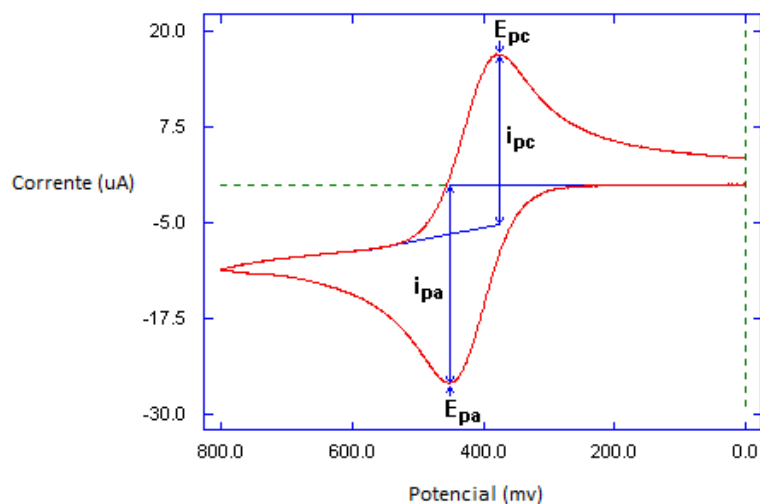


Figura 2-3. Voltamograma Cíclico (VC)

Se um sistema redox permanecer em equilíbrio em todo o varrimento de potencial, o processo redox é chamado de reversível. É possível caracterizar um voltamograma cíclico de um processo reversível usando os seguintes parâmetros:

- A separação do pico de potencial $\Delta E = (E_{pc} - E_{pa}) = 59 \text{ mV}$;
- A relação entre os picos de corrente deve ser $i_{pa}/i_{pc} = 1$ em todos os varrimentos;

- A função do pico de corrente $i_p/v^{1/2}$ onde v é a velocidade de varrimento, é independente de v ;
- O pico de corrente é dado pela seguinte equação: $i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$,

onde: n é o número de electrões transferidos por molécula, A é a área de superfície do eléctrodo (cm^2), C é a concentração (mol/cm^3) e D é a coeficiente de difusão (cm^2/s)

• Amperometria

A amperometria é uma técnica electroquímica bastante sensível, na qual o sinal de interesse é a corrente, a qual é proporcional à concentração das espécies electroactivas na amostra. Na amperometria, as diferenças geradas na corrente pelas oxidações ou reduções electroquímicas são monitorizadas directamente com o tempo enquanto o potencial, no eléctrodo de trabalho em relação ao eléctrodo de referência, é mantido constante. É a ausência de um potencial de varrimento que distingue a amperometria da voltametria. A técnica é implementada estabelecendo o potencial directamente para o valor desejado e, em seguida, medindo a corrente. Os biossensores amperométricos têm selectividade adicional na medida em que o potencial da oxidação ou redução usado para a detecção é característico da espécie redox.^{5,42}

2.2.2 Preparação do eléctrodo de trabalho

• Macroellectrodos

É no eléctrodo de trabalho que se vai depositar o mediador da reacção entre a glucose e a GOx. A preparação da tinta contendo o mediador é feita em duas etapas. Na primeira é adicionado à tinta de carbono metil-etil-cetona; a segunda etapa consiste na adição do mediador a esta pasta. Devido à elevada viscosidade da tinta de carbono, utilizou-se uma pipeta microman; esta última funciona com o auxílio de um pistão, como se pode ver na Figura 2-2, permitindo assim a medição mais controlada de pequenas quantidades de tinta. Em ambas as etapas a tinta é submetida a um banho de ultra-sons.

Seguidamente, é feita a deposição de 7 μL de pasta na superfície de um macroellectrodo de grafite pirolítica, utilizando uma vez mais a pipeta microman. Após a deposição da tinta, o eléctrodo é colocado numa estufa como a da Figura 2-3, durante um período superior a 18 horas e a uma temperatura de 60 °C.

A limpeza dos eléctrodos de trabalho obedeceu ao seguinte procedimento: polimento sobre a lixa de água, seguida de lavagem abundante com água, depois polimento sobre uma superfície aveludada numa suspensão de óxido de alumina ($\Phi = 0,3 \mu\text{M}$) seguida, novamente, de lavagem abundante com água desionizada.



Figura 2-4. Representação esquemática do funcionamento da pipeta microman



Figura 2-5. A) estufa química; B) banho de ultra-sons

- **Eléctrodos em substrato de papel**

A preparação da tinta referente aos eléctrodos em substrato de papel é a mesma que a feita para os macroeléctrodos. No entanto, tanto a deposição, assim como o processo de secagem destes eléctrodos é ligeiramente distinta. Ou seja, a deposição da tinta é feita utilizando um pincel nº2, a secagem é feita utilizando uma placa de aquecimento a uma temperatura de 60 °C.

2.2.3 Fabrico dos dispositivos em papel

O fabrico dos dispositivos compreende várias fases. Inicialmente é feita a impressão a cera do padrão estipulado (figura 2-6 A); seguidamente, e fazendo uso de uma placa de aquecimento, é feita a difusão da cera pelo substrato, criando assim barreiras à circulação dos fluídos. Posteriormente são feitas 4 máscaras distintas utilizando o *Universal Laser Systems VLS* (condições de corte: 40 % potencia; 100% velocidade; 1000 PPI): (i) máscara do circuito condutor (ii) máscara de eléctrodo de referência, (iii) máscara contra eléctrodo, (iv) máscara

eléctrodo de trabalho (figura 2-6 B). As máscaras são coladas ao substrato e são aplicadas as tintas respectivas para cada eléctrodo.

Para o desenho dos padrões utilizados foi utilizado o software Adobe Illustrator (Adobe Systems, Inc.); este programa é um editor vectorial.

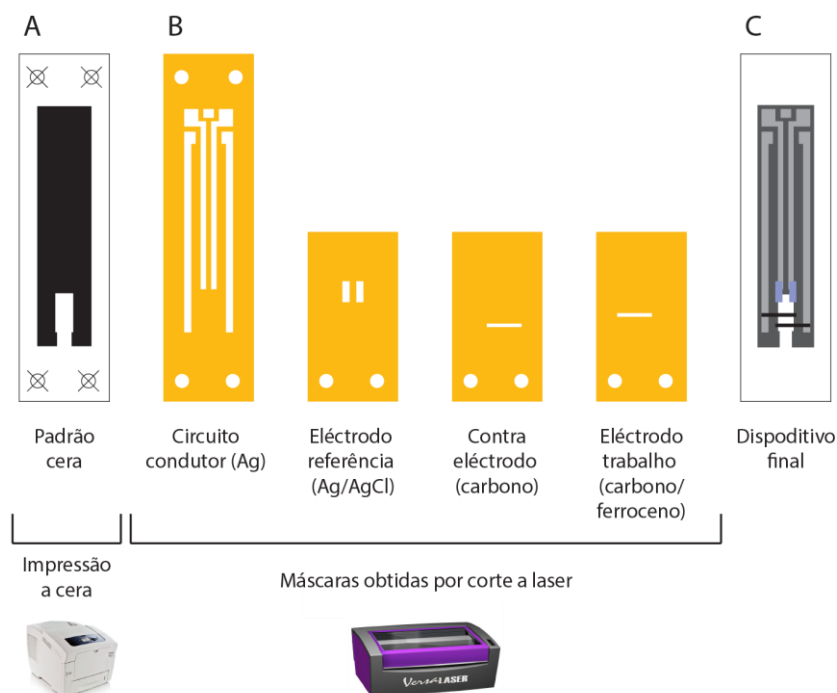


Figura 2-6 A) Padrão a cera ; B) Máscaras obtidas por corte a laser ; C) desenho representativo do dispositivo final

2.2.4 Impressão a cera

Para a impressão do suporte de cera onde os eléctrodos são posteriormente impressos utilizou-se a impressora Xerox ColorQube 8570, Figura 2-7. Esta técnica de impressão é uma tecnologia simples, sem cartuchos de impressão e que produz cerca de 90% menos desperdício de impressão que a tecnologia de impressão a laser. A tinta utilizada é fabricada a partir de um polímero não tóxico à base de parafina, semelhante a um lápis de cera. A impressora utiliza como tinta blocos de cera sólida. O processo de impressão a tinta sólida divide-se em três etapas: primeiro a unidade de manutenção do tambor limpa a superfície do mesmo eliminando resíduos de tinta de impressões anteriores; seguidamente, o rolo de manutenção aplica rapidamente uma camada microscópica de óleo de silicone ao tambor aquecido, para obter uma libertação de tinta fiável. Logo de seguida, a cabeça de impressão (uniformemente aquecida a 135 °C) aplica gotas microscópicas de tinta derretida no tambor rotativo (que mantém uma temperatura intermédia de 65 °C). As gotas de tinta quando atingem o tambor passam quase instantaneamente a um estado semi-sólido. O papel a ser impresso

passa pelo pré-aquecedor e pára dentro de uma zona de pressão formada pelo rolo de pressão e pelo tambor de impressão. Sob calor e pressão, a imagem é transferida do tambor para o papel numa passagem única. No momento em que o papel sai da impressora, a tinta está totalmente seca e o papel impresso está pronto para ser usado imediatamente. Este processo é bastante rápido, sendo o tempo total do processo de apenas 5 segundos.^{43,44}

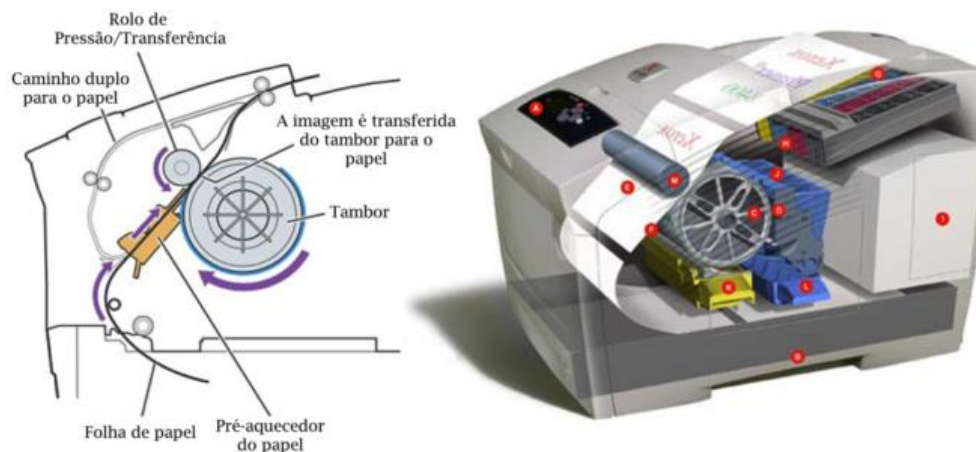


Figura 2-7. Visão esquemática de uma impressora de tinta sólida (adaptado de ⁴³)

2.2.5 Impressora de jacto de tinta

Para a impressão a jacto de tinta da enzima utilizou-se uma impressora Canon modificada. Esta impressora utiliza um sistema térmico para a libertação das gotas de tinta. O volume das gotas expelidas têm entre 1-5 pL. A resolução da impressora é de 96mm×240 [DPI], este parâmetro é definido pela distância entre o *nozzle* e o valor do passo de varrimento transversal e não se pode controlar (o seu valor é fixo). A cabeça de impressão é feita de material plástico (PET), silício e óxido de silício, Figura 2-8.



Figura 2-8. cabeça de impressão de uma impressora Canon

2.2.6 Solução para impressão do componente biológico do biossensor

Para se poder imprimir a GOx, teve de se preparar uma solução que estivesse de acordo com as especificações da impressora a utilizar. Assim, a viscosidade da solução deve estar entre 1-3 cP. Por esse motivo, adicionou-se glicerol (20% w/v). A tensão superficial deve ser entre 28-33 dyne/cm e, por isso adicionou-se uma gota de Triton X. A solução foi feita em tampão PBS 0,1 M pH 6,5.

3. Apresentação e Discussão de Resultados

O objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de biossensores enzimáticos com aplicações biomédicas utilizando um substrato de papel, onde os eléctrodos e a enzima serão impressos, tornando estes dispositivos simples, portáteis, descartáveis, económicos e amigos do ambiente. Note-se que uma vez que a utilização destes dispositivos se destina a fluídos humanos, especificamente o sangue, o descarte destes deve ser feito através da incineração.

3.1. Selecção do mediador redox - ensaios em solução

Em toda esta fase do trabalho, bem como nas etapas seguintes, foi usada a técnica de voltametria cíclica, para análise e caracterização das soluções dos mediadores redox. O grau de reversibilidade dos processos electroquímicos não foi analisada, pois esse parâmetro não era prioritário, nesta fase do projecto. Os parâmetros que influenciaram a escolha do mediador foram a intensidade das correntes de oxidação/redução e o potencial dos picos catódicos e anódicos. Pretendeu-se assim escolher um mediador com um potencial de redução baixo, para que o potencial de funcionamento do biossensor fosse o mais próximo de zero, não comprometendo a selectividade da análise.

Numa primeira abordagem foram testados os diferentes doadores electrónicos da GOx em solução, fazendo uso de macroeléctrodos de grafite pirolítica. Na célula voltamétrica foi colocado 0,5 mM de mediador em electrólito suporte, 123 U de glucose oxidase e crescentes quantidades de glucose. Inicialmente testou-se o ferricianeto, dissolvendo o mesmo em 50 mM tris 0,1 M KCL, e em KCL 1 M (Figura 3-1). Após a colocação da GOx na célula electroquímica

foram adicionadas concentrações de glucose crescentes, porém, nunca foi possível detectar uma resposta a este analito.

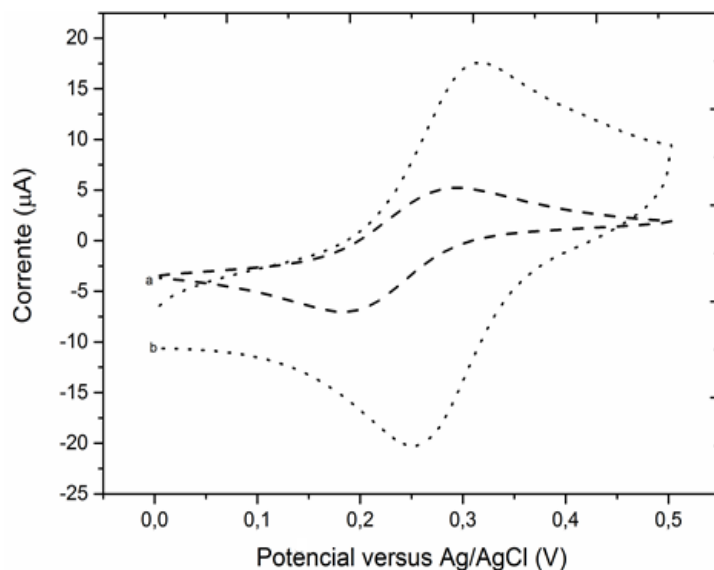
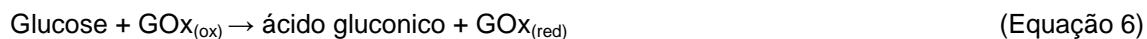


Figura 3-1-A) voltamograma cíclico do ferricianeto de potássio em 1 M KCl pH 7,6; B) voltamograma cíclico do ferricianeto de potássio em 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 6,5, velocidade de varrimento 50mV/s.

O perfil corrente-potencial apresenta um pico anódico a 0,317 V versus Ag/AgCl quando em 1 M KCl, e 0,293 V versus Ag/AgCl, quando em 50 mM Tris, 0,1M KCl, correspondente à redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, tal como descrito na Equação 3. Os respectivos picos catódicos ocorrem a 0,254 V e 0,181V, respectivamente. O potencial formal de redução, E^0 , dado pela média dos potenciais de pico $(E_{pa} + E_{pc})/2$, é igual a 0,285 V vs Ag/AgCl, em 1 M KCl, e 0,237 V vs Ag/AgCl, em 50mM Tris 0,1M KCl. A separação entre picos é de $\Delta E = 0,063$ V e $\Delta E = 0,127$ V, respectivamente. O valor encontrado na literatura⁴⁵ foi de 0,273 V vs Ag/AgCl, este valor é próximo do obtido com o ferricianeto em 1 M KCl. O valor da razão entre as intensidades das correntes dos picos redox I_a/I_c é de 0,87 e 0,75, respectivamente. Para um processo reversível, era expectável que $I_a/I_c = 1$ e $\Delta E = 59\text{mV}$.



Apesar do ferricianeto apresentar uma boa resposta electroquímica, não foi capaz de interagir com a GOx, dando sequência ao processo catalítico. Assim, após os resultados insatisfatórios obtidos com o ferricianeto de potássio, testou-se o sal derivado do ferroceno, o iodeto de ferrocenometil trimetilamónio (0,5 mM) em PBS 0,1M pH 6,5. Neste caso, após adicionar glucose oxidase ao electrólito suporte, foi possível visualizar uma resposta catalítica à adição consecutiva de glucose. Este fenómeno deve-se a um aumento da corrente de redução causada pela “reciclagem” do mediador devido ao seu acoplamento com a reação enzimática, tal como indicado nas Equações 4, 5 e 6.



No entanto, o sinal voltamétrico apresentava dois picos anódicos (Figura 3-2) ao invés de um só. O E^0 associado ao derivado do ferroceno (equação 7), é de 0,456 V vs Ag/AgCl, valor concordante com o obtido na literatura (0,45 V vs Ag/AgCl), mas o segundo potencial de redução presente na VC é de 0,528 V vs Ag/AgCl, valor aproximado ao valor tabelado do potencial de redução do iodeto (Equação 8). A razão entre os picos de potencial associados ao ferroceno é de 0,95. Para poder confirmar que o segundo pico anódico se devia à presença de iodeto na composição deste mediador, foi adicionado um sal de iodeto à solução, tendo-se verificado que a intensidade deste segundo pico aumentou. Havendo a possibilidade de o mesmo mascarar o sinal do primeiro, interferindo assim na análise dos resultados, o iodeto de ferrocenometil trimetilamônio foi abandonado.

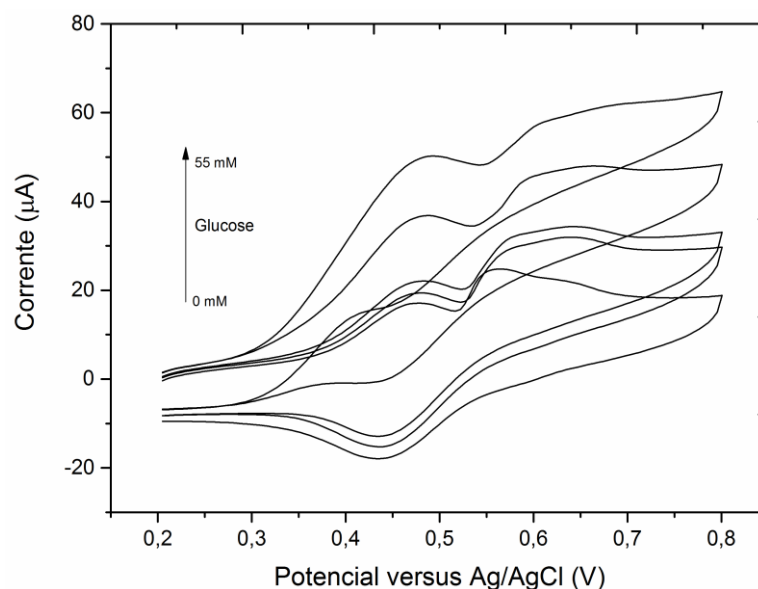


Figura 3-2- Voltamogramas cíclicos de iodeto de ferrocenometil trimetilamônio em 0,1M fosfato de sódio pH 6,5, na presença de várias concentrações de glucose (0-55 mM), velocidade de varrimento 35 mV.

Seguidamente, testou-se o composto 1'1-dimetilferroceno. Porém, apesar de se ter acrescentado alguns solventes orgânicos, este apresentava uma elevada insolubilidade em

água, precipitando muito facilmente e não permitindo, por isso, um estudo electroquímico do mesmo em solução. Por conseguinte, foi posto de parte.

Por último, foi testado o ácido ferrocenocarboxílico, o qual apresentou resultados bastante satisfatórios. É um composto bastante solúvel em água, e o seu sinal voltamétrico é bastante intenso e estável, tendo sido possível observar a reacção catalítica à adição de glucose, na presença de GOx.

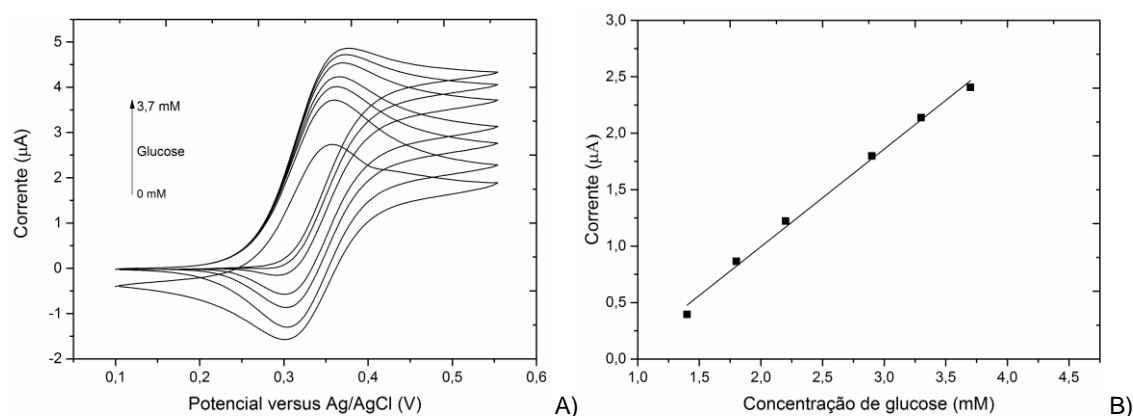
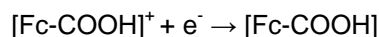


Figura 3-3. A) Ácido ferrocenocarboxílico 0,5 mM em 50 mM Tris pH 7,6, 0,1 M KCl, 123U GOx, na presença de concentrações crescentes de glucose, velocidade de varrimento 10mV/S. B) Recta de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose ($y = 0,86448x - 0,73351$; $r^2=0,99$)



(Equação 11)

O voltamograma cíclico apresenta um pico anódico a 0,359 V, correspondente à redução do $[\text{Fc-COOH}]^+$ a $[\text{Fc-COOH}]$ (Equação 11), e o respectivo pico catódico a 0,300 V. O potencial formal de redução é igual a 0,333 V vs Ag/AgCl, e a separação entre picos é de $\Delta E = 0,059$ V. O potencial de redução deste composto é concordante com o valor encontrado na literatura, 0,35 V.⁴⁶ A razão das intensidades dos picos é $I_a/I_c = 1,73$, para um processo reversível, era expectável que $I_a/I_c = 1$ e $\Delta E = 59$ mV, apenas se verificou um destes parâmetros.

À semelhança do que aconteceu com o iodeto de ferrocenometil trimetilamónio, mediante a adição de quantidades crescentes de glucose, a corrente catódica aumentou progressivamente até atingir a saturação. Este comportamento é típico de um mecanismo electrocatalítico, EC'.

A seguir a esta análise preliminar dos possíveis mediadores redox, enquanto aceitadores de electrões da GOx, na presença do seu substrato, a glucose (ambos em solução), seguiu-se para uma nova etapa deste projecto, a incorporação do mediador em pasta de carbono.

3.2. Incorporação dos mediadores redox em pasta de carbono

Depois de estudar o comportamento electroquímico dos vários derivados do ferroceno em solução, passou-se para as pastas de carbono nas quais se pretende que o mediador seja incorporado. Foram testados nesta etapa o ferroceno, o 1'1-dimetilferroceno e o ácido ferrocenocarboxílico.

Devido à elevada viscosidade da tinta de carbono, e por forma a tornar mais fácil o seu manuseamento, foi adicionado à mesma o solvente orgânico metiletilcetona (MEK) (2ml para 8g de pasta). Para além dos derivados do ferroceno, foi também incluído no estudo o próprio ferroceno, o qual também é insolúvel em sistemas aquosos e, por esse motivo, não foi testado anteriormente.

Como era de esperar, os diferentes compostos em tinta de carbono apresentaram resultados diferentes daqueles obtidos em solução. Uma vez que o mediador redox está incorporado numa pasta e não directamente em solução, o seu sinal vai apresentar correntes mais baixas. Refira-se que quando se utiliza pasta de carbono é necessário esperar que ocorra a hidratação da mesma para haver uma estabilização do sinal voltamétrico. Um grande obstáculo nesta etapa foi a reprodutibilidade dos eléctrodos, para o qual terá contribuído a hidratação variável da pasta.

Nas figuras que se seguem podem ver-se os voltamogramas cíclicos dos diversos mediadores na forma incorporada na tinta de carbono. Todos os compósitos foram aquecidos numa estufa química a 60 °C, *over night*. O electrólito de suporte foi 50 mM Tris ,0,1 M KCl, pH 7,6.

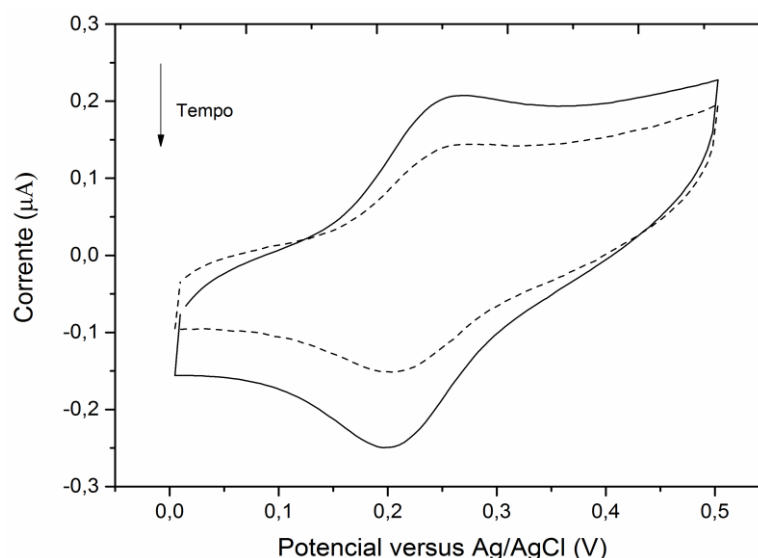
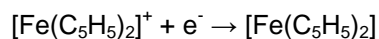


Figura 3-4. Voltamograma cíclico de um compósito de 5 mg de ferroceno incorporado em 21 µL tinta de carbono/MEK, (---) primeiro ciclo; (—) ciclos nº 60, electrólito suporte 50 mM Tris ,0,1 M KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50mV/s

Na Figura 3-4. podemos visualizar uma alteração nos valores de correntes faradaicas e capacitivas; no entanto, os picos de potencial redox continuaram sempre perceptíveis. O sinal

apresenta um valor de potencial de redução de 0,232 V vs Ag/AgCl, valor suficientemente baixo para não comprometer a selectividade electroanalítica, $\Delta E = 0,073$ V. A razão de intensidade dos picos é $I_a/I_c = 0,83$. O valor de potencial de redução encontrado na literatura foi de 0,385 V vs Ag.



(Equação 12)

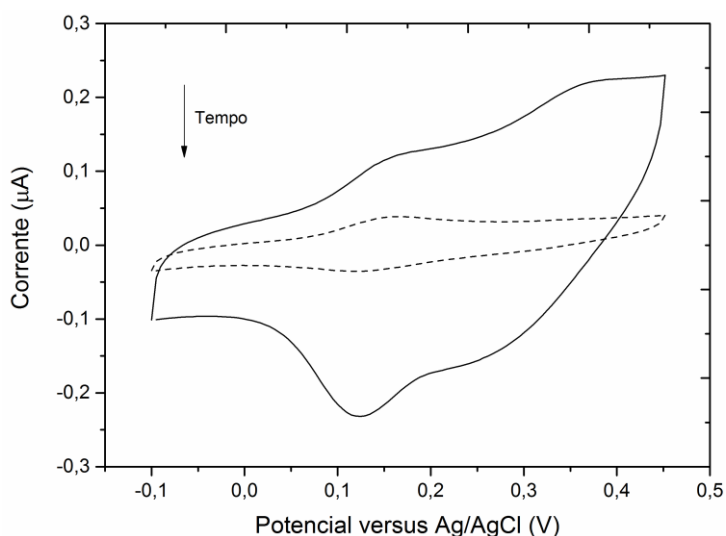


Figura 3-5 - Voltamograma cíclico de um compósito de 5 mg de 1,1' dimetilferroceno incorporado em 21 μL de pasta de carbono/MEK, (---) primeiro ciclo; (—) ciclos nº 50, electrólito suporte 50 mM Tris , 0,1 M KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 35 mV/s

Na figura 3-5 houve uma grande alteração na corrente entre o 1º e o 50º ciclo e os picos redox não são tão perceptíveis como no caso do ferroceno. A razão entre a intensidade da corrente nos picos foi $I_a/I_c = 0,54$, valor muito distante da unidade.

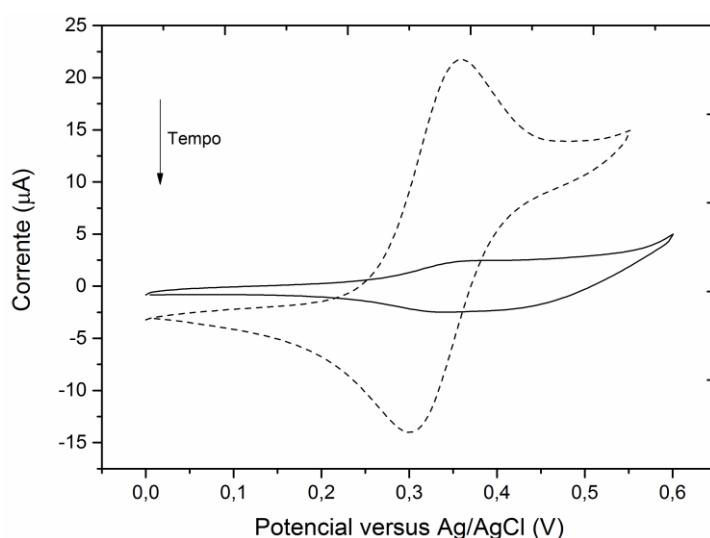


Figura 3-6. Voltamograma cíclico de um compósito de 2.7 mg ácido ferrocenocarboxílico incorporado 21 μL tinta de carbono, (---) primeiro ciclo; (—) ciclos = 50, electrólito suporte 50 mM Tris , 0,1 M KCl, pH 7,6 , velocidade de varrimento 50mV/s

Na figura 3-6 é possível ver um sinal muito intenso e com perfil adequado no primeiro ciclo, mas este foi piorando ao longo do tempo, sendo que ao fim de 50 ciclos é quase imperceptível visualizar a existência dos picos redox.

Após analisar os resultados anteriores, decidiu-se escolher o ferroceno para continuação deste trabalho, pois foi este que apresentou globalmente os melhores resultados. O trabalho prosseguiu então com este mediador electrónico, procedendo-se à optimização das proporções a utilizar. Assim, foram testadas diferentes combinações entre os componentes:

- 5mg de ferroceno e 21 μ L de pasta;
- 10mg de ferroceno e 21 μ L de pasta;
- 5mg de ferroceno, 5 mg de glucose oxidase e 21 μ L de pasta;
- 10mg de ferroceno, 5 mg de glucose oxidase e 42 μ L de pasta.

A toda a pasta utilizada nos ensaios foi adicionado etil metil cetona (para 8 g de pasta 2mL de MEK).

À semelhança do que foi feito na secção 3.1, os eléctrodos foram testados por VC. Desta vez a solução colocada na célula voltamétrica continha apenas electrólito ao qual se adicionou 123 U de glucose oxidase (excepto quando a pasta já incorporava a enzima) e crescentes concentrações de glucose. A primeira combinação deu bons resultados, ou seja, no voltamograma cíclico era bem visível a existência dos picos de oxidação e redução do ferroceno. A segunda combinação, que usava uma maior concentração de ferroceno, estranhamente deu um sinal onde não eram perceptíveis os picos de potencial redox. As duas últimas combinações, ambas com GOx, apresentaram voltamogramas cíclicos onde não se visualizava pico de redução.

Uma vez que a combinação inicial foi a que apresentou melhores resultados, optou-se por continuar o trabalho usando 5 mg de ferroceno e 21 μ L de pasta.

Para além dos testes com diferentes combinações de mediador, foram também, testadas, para a combinação escolhida, diferentes temperaturas(temperatura ambiente; 60 °C; 120 °C) e tempos de permanência na estufa (20 min, 5 h, 14 h)

Os melhores resultados foram obtidos com a combinação: temperatura 60 °C, e em tempo de secagem superior a 14 horas(*over night*).

Na Figura 3-7 pode ver-se a resposta electroquímica de um eléctrodo de trabalho contendo ferroceno dissolvido em pasta de carbono submetido a concentrações de glucose crescentes, na presença de GOx (em solução).

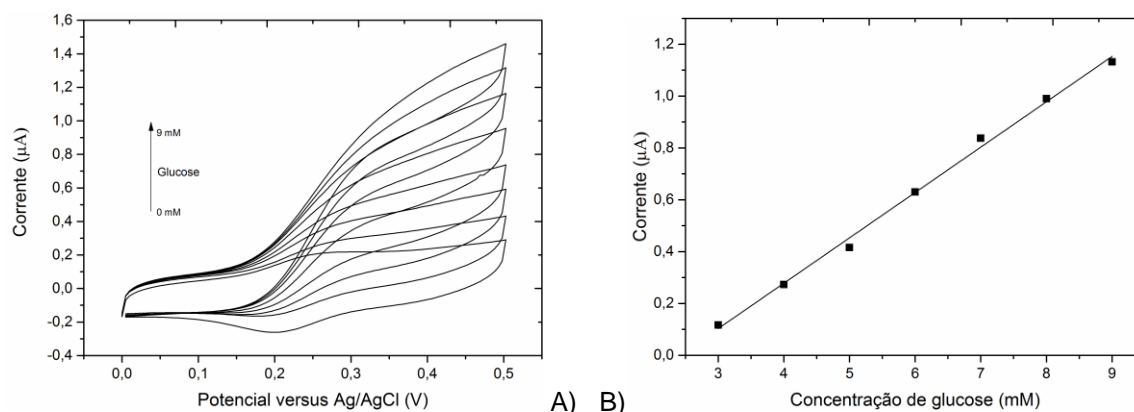


Figura 3-7- A) Voltamograma cíclico do ferroceno/pasta de carbono de carbono, *over night* em estufa a 60 °C, na presença de 123 U de GOx e várias concentrações de glucose(0-9 mM), velocidade de varrimento 50mV/s B) curva de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose ($y = 0,175x - 0,4219$; $r^2=0,995$)

Para o intervalo de concentrações 3-9 mM houve uma resposta linear, com um bom coeficiente de correlação ($r^2 = 0,995$). A sensibilidade, dada pelo declive da curva de calibração $\Delta I_{cat}/\Delta [Glu]$, foi de $0,175 \mu A.mM$.

A concentrações de glucose superiores a resposta do eléctrodo desviou-se da linearidade e aproximou-se de um valor constante, independente da concentração de glucose. Este comportamento é típico de processos enzimáticos onde a reacção é limitada pela saturação de enzima.

3.3. Eléctrodos de papel

Após os bons resultados obtidos com o compósito de ferroceno e pasta de carbono decidiu-se avançar no trabalho transferindo a receita usada na preparação de pasta para os eléctrodos impressos em papel.

Nesta etapa foram utilizados eléctrodos em papel adaptados por M. Costa. (CENIMAT/I3N) a partir da ref.⁴⁷. Este artigo descreve a construção de um dispositivo feito em papel e compatível com o leitor comercial *TRUETrack™ blood glucometer*, onde todos os eléctrodos são impressos com tinta de grafite de acordo com o design ilustrado na Figura 3-8.

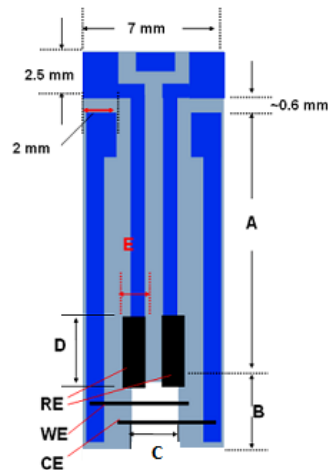


Figura 3-8. Diagrama esquemático do dispositivo feito em papel, adaptado de⁴⁸, A=14mm; B=4mm; C=1,2mm; D=4mm; E=1,5 mm

Inicialmente, e para testar a viabilidade destes eléctrodos integrados e impressos em papel com tinta de carbono, decidiu-se fazer um estudo do comportamento electroquímico dos eléctrodos quando impregnados com uma solução contendo 50 mM de ácido ferrocenocarboxílico.

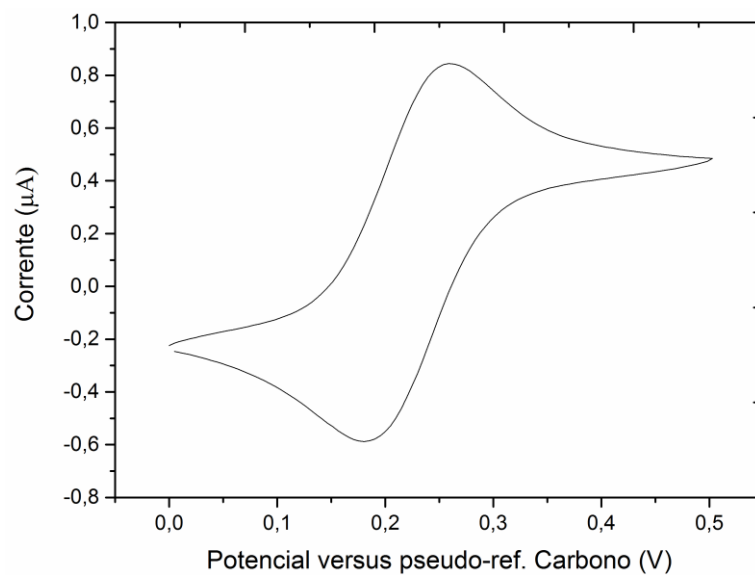


Figura 3-9-Voltamograma Cíclico de 0,055 mM ácido ferroceno carboxílico em 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 7,6 em tira de papel cujos eléctrodos eram de carbono, velocidade de varrimento 50 mV/s.

A Figura 3-9 mostra o VC assim obtido. O pico anódico está posicionado a 0,259 V e o respectivo pico catódico a 0,181 V. O potencial formal de redução é igual a 0,220 V vs Ag/AgCl, $\Delta E = 0,078$ V, e a razão das intensidades dos picos é 1,43. Para um processo reversível, era expectável que $I_a/I_c=1$ e $\Delta E=59$ mV. Comparando estes resultados com os obtidos

anteriormente na figura 3-3, ambos realizados com a mesma solução de 0,5mM ácido ferroceno carboxílico em 50mM Tris 0,1M KCl pH 7,6, é possível verificar que o potencial de redução e oxidação se desviou ligeiramente. Esta alteração pode ser explicada pelo facto de estes dispositivos utilizarem uma pseudo referência de carbono, ao invés da referência de Ag/AgCl usada anteriormente. Contudo, a posição também varia de ensaio para ensaio, tal como se pode ver no teste de reprodutibilidade mais a frente.

Ainda utilizando este *batch* de eléctrodos, testou-se a reprodutibilidade dos mesmos, utilizando a mesma solução de 0,5 mM ácido ferrocenocarboxílico em 50 mM Tris 1M KCl pH 7,6.

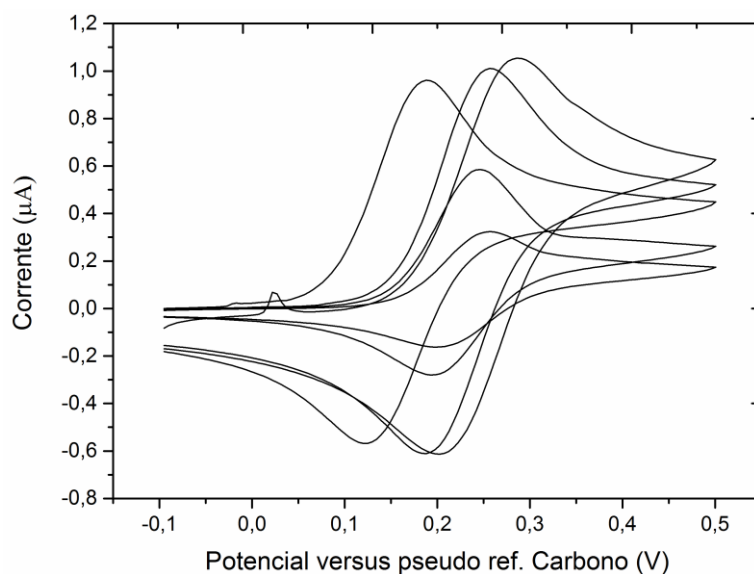


Figura 3-10. Voltamogramas Cíclicos de 0,5 mM ácido ferrocenocarboxílico em 50 mM Tris pH 7,6 , 0,1 M kCl pH 7,6 de diferentes fitas de papel compreendendo um sistema de 3 eléctrodos impressos com tinta de carbono, sinal medido após 1 minuto da deposição de uma gota de 3 µL da solução contendo o mediador.

Tal como se pode ver na Figura 3-10, o sinal obtido pelos eléctrodos foi muito pouco reprodutível, apresentando VC com picos de oxidação e redução em diferentes posições e com intensidades diferentes. Contudo, os resultados são razoavelmente satisfatórios na medida em que confirma a funcionalidade dos mesmos.

3.3.1 Incorporação do mediador nos eléctrodos de papel

Seguidamente, resolveu-se imprimir novos eléctrodos em papel onde apenas o contra eléctrodo era feito com tinta de carbono. O eléctrodo de trabalho foi impresso recorrendo à pasta contendo ferroceno, enquanto os eléctrodos de referência foram feitos utilizando tinta condutora de Ag/AgCl.

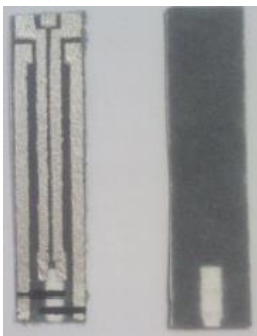


Figura 3-11- Eléctrodos impressos em papel, contendo ferroceno

Na Figura 3-12 seguinte mostra-se o voltamograma cíclico destes eléctrodos já contendo o mediador no eléctrodo de trabalho.

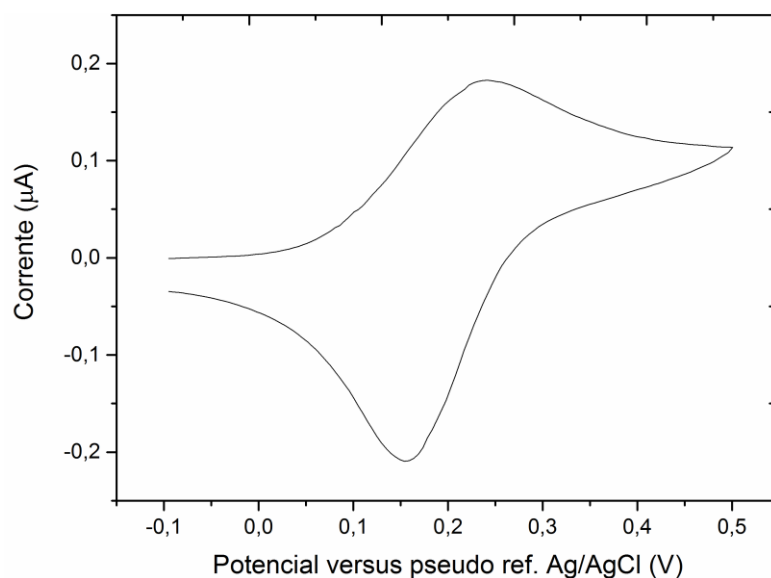


Figura 3-12. Voltamograma Cíclico do ferroceno/pasta de carbono no eléctrodo de trabalho após adição de solução 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 7,6.

Neste VC o pico anódico está a 0,242 V e o respectivo pico catódico a 0,154 V. O potencial formal de redução é igual a 0,198 V vs Ag/AgCl, $\Delta E = 0,088V$. Pode visualizar-se que $I_a < I_c$ ($I_a / I_c = 0,87$). Contudo, tal como se verifica à frente, proporciona a funcionalidade biossensorial pretendida.

Assim como anteriormente, fez-se um estudo da reprodutibilidade dos eléctrodos. Na figura 3-12 encontra-se o sinal de diferentes fitas de papel, todas feitas sob as mesmas condições, impregnadas com a mesma quantidade de solução 50 mM Tris pH 7,6, 0,1M KCl, e após o mesmo tempo de aplicação da mesma.

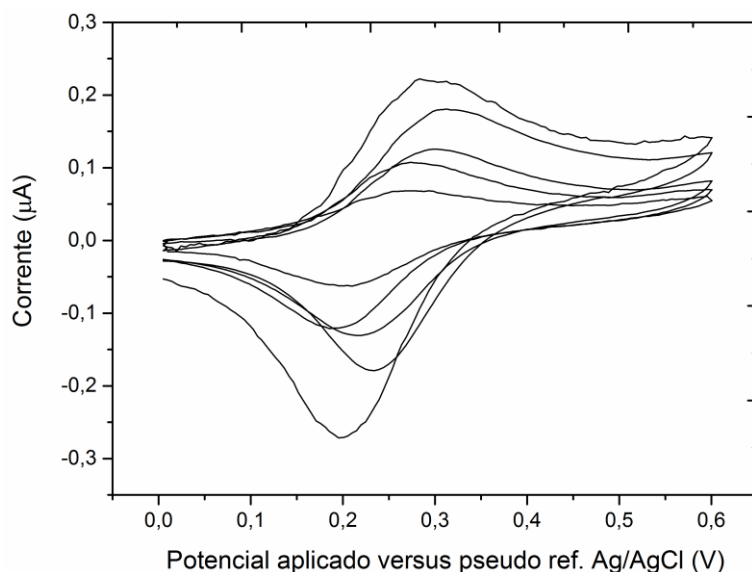


Figura 3-13. Voltamograma Cíclico de eléctrodos de papel contendo ferroceno no electrodo de trabalho, após adição de uma gota de 3 μL da solução 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 7,6.

Mais uma vez, constatou-se que os voltamogramas cíclicos são muito poucos reprodutíveis, mas, ao contrário do que havia acontecido anteriormente, a variação é mais grave ao nível do valor da intensidade do pico e não tanto no valor dos potenciais redox. A discrepância nos valores de corrente pode ser explicado pela forma como os eléctrodos de trabalho são impressos. A pasta utilizada não é muito homogénea, sendo visível alguns grumos; como os eléctrodos são impressos manualmente, utilizando um pincel, pode acontecer que alguns eléctrodos acabem por ficar com mais quantidade de mediador que outros, causando por isso uma variação nas correntes faradaicas. O facto de se ter optado por utilizar como pseudo referência tinta de Ag/AgCl pode justificar o porquê dos potenciais redox se manterem razoavelmente estáveis.

Para além do estudo da reprodutibilidade, também se averiguou a estabilidade do sinal nas fitas de papel ao longo do tempo.

É possível verificar, que ao longo do tempo, ocorre um decaimento pronunciado da corrente; este pode ser explicado pelo processo contínuo de absorção da solução ao longo do substrato, e da subsequente difusão do mediador da pasta de carbono para o papel circundante. Como tal, nos futuros ensaios dever-se-à controlar o tempo de espera entre a aplicação da gota e o início da medição.

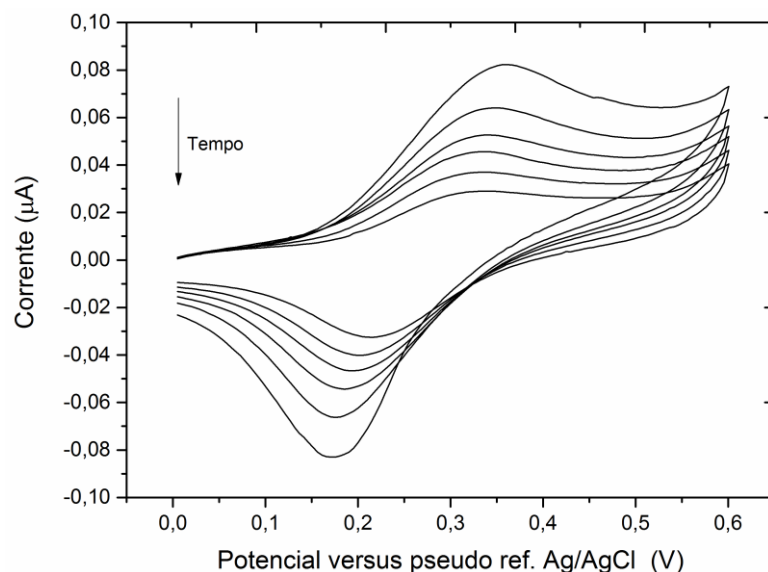


Figura 3-14. Variação do sinal voltamétrico ao longo do tempo (5 minutos). Foi depositada uma gota de 3 μL de solução 50 mM Tris 0,1 M KCl pH 7,6 numa fita de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho, velocidade de varrimento 50mV/s.

Após o estudo da reprodutibilidade e da estabilidade, tendo presente as implicações destes parâmetros, seguiu-se para a adição de enzima e glucose aos eléctrodos. Assim, nos estudos efectuados em seguida houve sempre o cuidado de fazer as medições em fitas diferentes após o mesmo tempo de aplicação da solução de glucose.

3.3.2 Aplicação da GOx no eléctrodo de trabalho

- **Aplicação de gota de enzima pela técnica de “casting”**

A adição da enzima foi feita, inicialmente, feita utilizando uma micropipeta. Foram testadas diferentes concentrações de enzima 450 U, 500 U, 600 U, 700 U, esta foi sempre preparada em PBS 0,1M pH 6,5. Nesta etapa, foi também adicionado à solução de GOx, para conferir alguma viscosidade, glicerol 5% (p/v). A solução de GOx foi aplicada na parte de trás do dispositivo, na zona do eléctrodo de trabalho. Devido à capacidade absorvente do papel utilizado, a gota de 1 μL , espalhou-se rapidamente por toda a zona de teste.

A adição de glucose só foi feita após 20 minutos de deposição da GOx; este período de secagem realizou-se à temperatura ambiente. Com 450 U de GOx não foi possível visualizar uma resposta à adição de glucose. Para 500 U apenas foi visível uma alteração do sinal electroquímico para valores de glucose superiores a 20 mM. Para a concentração de 600 U foi possível visualizar uma resposta à adição de glucose para adições de 5 mM. Uma vez que se pretende a criação de um dispositivo de baixo custo, e houve uma boa resposta a 600 U, a concentração de 700 U foi posta de parte.

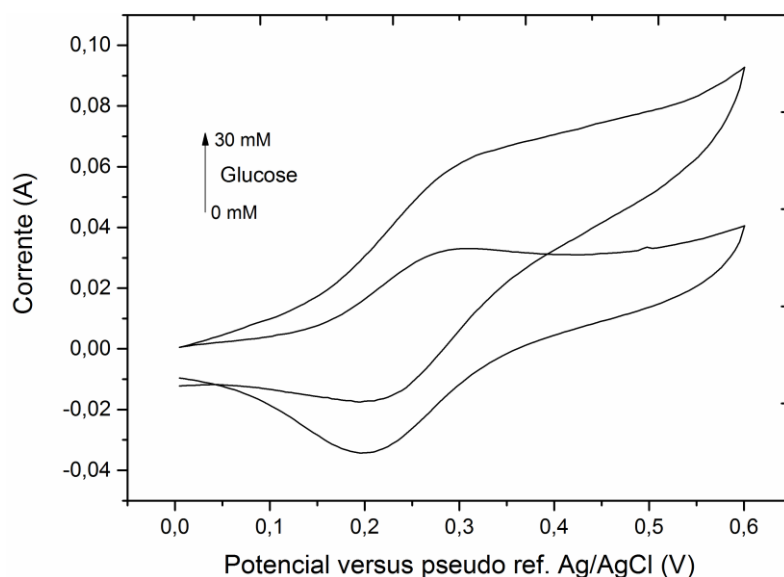


Figura 3-15. Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho e enzima no substrato, com concentrações crescentes de glucose, em electrólito suporte 50 mM 0,1 Tris KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50 mV/S

É visível nestes voltamogramas que as correntes são significativamente mais baixas que nos voltamogramas anteriores; pode ter acontecido que no fabrico deste *batch* de eléctrodos a quantidade de ferroceno aplicada tenha sido menor. Foi possível visualizar uma resposta catalítica à adição de glucose, provando assim a viabilidade deste dispositivo. Por forma a melhorar e rentabilizar este dispositivo, seguiu-se para a adição de enzima através da impressão a jacto.

- **Aplicação de GOx pela técnica de impressão a jacto (*inkjet printing*)**

O processo de imprimir a enzima por jacto de tinta fez-se com recurso a uma impressora Canon modificada. Esta impressora requer que a solução a imprimir obedeça a alguns parâmetros de viscosidade e tensão superficial. Por esse motivo, antes de se iniciarem as impressões, foi necessário submeter a solução de enzima a alguns testes prévios, para verificar se esta apresentava as condições ideais para impressão. Para a realização destes testes foi considerada a água como solução de referência.

O primeiro teste foi um teste de viscosidade, (*Ostwald viscometer*). No entanto, o valor obtido, utilizando a equação 13, não era o ideal, pois aproximava-se muito do limite inferior. Para melhorar este parâmetro foi adicionado à solução maior quantidade de glicerol. Foram feitos testes em soluções com diferentes quantidades de glicerol, a quantidade mais favorável para a impressão foi de 20% (p/v).

$$\eta_x = \eta_{ref} * (\rho_x \cdot t_x / \rho_{ref} \cdot t_{ref}) \quad (\text{Equação 13})$$

onde:

η_{ref} é a viscosidade da água;

η_x é a viscosidade da solução;

ρ é a densidade;

t é o tempo.

Depois de encontrar o valor ideal de viscosidade submeteu-se a nova solução a um teste de tensão superficial, *Stalagmometer drop count comparative method*. O valor obtido foi de 73,98 dyne/cm, valor muito superior ao pretendido. Foi então adicionado à solução uma gota de Triton X, baixando o valor para 32,35 dyne/cm. Os valores foram calculados com recurso às equações 14 e 15.

$$\sigma_{rel}(T) = (N^0 D_{ref}(T) * \rho_x(T)) / (N^0 D_x(T) * \rho_{ref}(T)) \quad (\text{Equação 14})$$

$$\sigma_x(T) = \sigma_{rel}(T) * \sigma_{ref}(T) \quad (\text{Equação 15})$$

onde:

σ_{rel} é a tensão superficial da água;

σ_x é a tensão superficial da solução

ρ é a densidade;

O segundo passo para a impressão da enzima foi definir onde é que a impressora iria depositar a GOx, assim como anteriormente, a enzima foi impressa na parte de trás do dispositivo, sobre o eléctrodo de trabalho.

A primeira impressão realizada utilizou uma solução de glucose oxidase 600 U, e foram feitas 50 passagens sobre a zona definida para a impressão mas, não foi possível observar uma reacção à adição de glucose.

Uma vez que, a concentração de 600 U de GOx não foi suficiente para se observar uma resposta à adição de glucose e que, a impressora utiliza quantidades numa ordem de grandeza muito inferior à anterior, resolveu-se decuplicar a solução de GOx. Com esta nova concentração de 6000 U de GOx, foram feitas várias impressões, alterando o número de passagens sobre a zona a imprimir. Foram testadas 25, 35 e 50 passagens. Após 25 passagens não se visualizou resposta à adição de glucose; com 35 passagens observou-se uma resposta à glucose mas esta não era na gama de linearidade pretendida. A 50 passagens obteve-se bons resultados.

Nesta etapa foi realizada voltametria cíclica e amperometria.

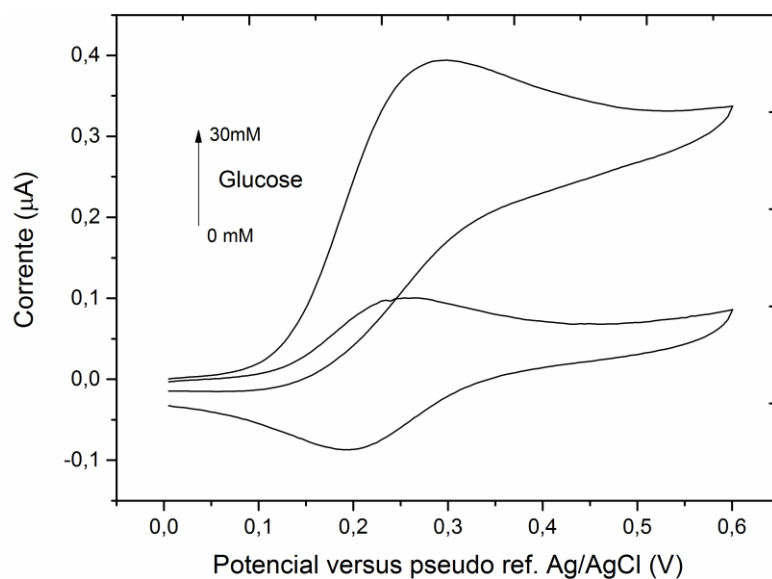


Figura 3-16 Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de papel contendo ferroceno no eléctrodo de trabalho e enzima impressa no electrodo de trabalho, com concentrações crescentes de glucose, em electrólito suporte 50mM 0,1 Tris KCl, pH 7,6, velocidade de varrimento 50mV/S

Seguidamente ao estudo de voltametria cíclica, foi realizada uma análise amperométrica. De acordo com o descrito na secção 2.2.1, estabeleceu-se um potencial fixo de 0,3 V, e foi medida a corrente neste potencial. Com os dados adquiridos por esta técnica foi possível construir uma recta de calibração da corrente em função da concentração de glucose (Figura 3-17).

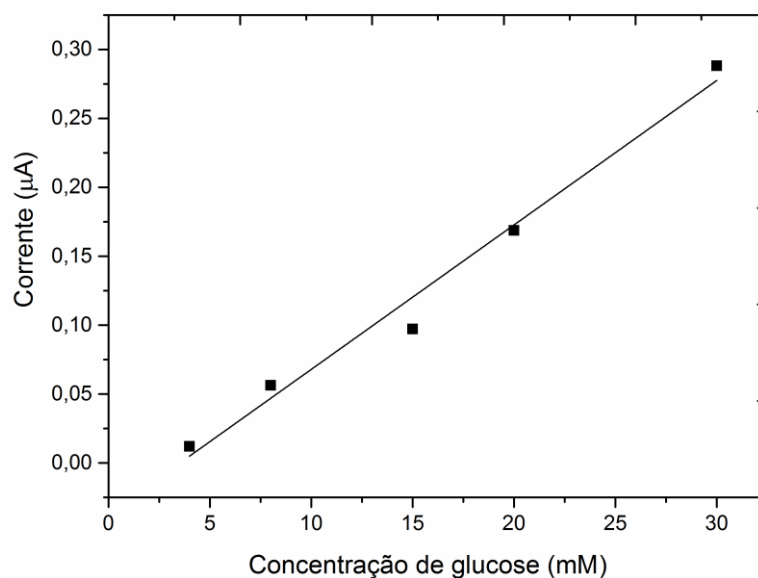


Figura 3-17. Recta de calibração da variação da corrente com a concentração de glucose ($y = 0,0105x - 0,0369$; $r^2=0,98$)

Foi possível observar que para o intervalo de concentrações 4 mM a 30 mM houve uma resposta linear, com um bom coeficiente de correlação ($r^2 = 0,98$). A sensibilidade, dada pelo declive da curva de calibração $\Delta I_{\text{cat}}/\Delta[\text{Glu}]$, foi de $0,0105 \mu\text{A}.\text{mM}^{-1}$.

3.3.3 Comparação com eléctrodos comerciais

Após a optimização dos eléctrodos foi feita uma validação dos mesmos utilizando a máquina comercial *TRUETrack™ blood glucometer*. Este aparelho reconheceu os nossos eléctrodos, no entanto para várias concentrações de glucose o dispositivo nunca deu um valor numérico. Uma vez que pela voltametria cíclica se havia verificado a viabilidade do dispositivo, foi efectuada uma comparação entre os nossos eléctrodos e os comerciais, na tentativa de perceber o problema.

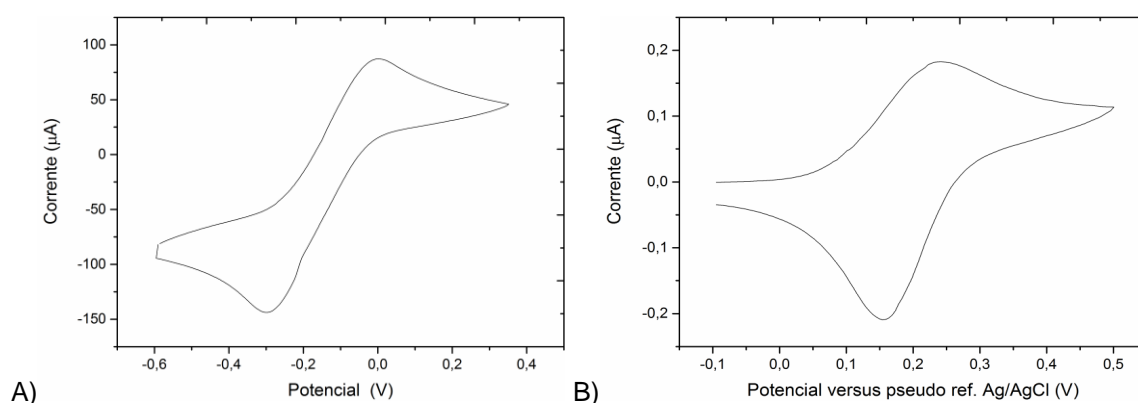


Figura 3-18 Comparação entre o sinal voltamétrico de : A) Eléctrodos comerciais e B) Eléctrodos em papel

Foi possível verificar que as correntes produzidas pelos nossos eléctrodos eram muito inferiores às produzidas pelos eléctrodos comerciais, , figura 3-18, pelo que se concluiu que as correntes produzidas pelos eléctrodos de papel estavam abaixo do limite de detecção do aparelho, podendo isto dever-se à concentração de mediador ou ao potencial do mesmo.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Os biossensores, em particular os biossensores de glucose, são uma tecnologia que tem vindo, nos últimos 50 anos, a obter um grande destaque no meio científico. No entanto, continuam a existir diversos desafios relacionados com a obtenção de uma monitorização precisa e confiável da glucose. Esta dissertação explora os benefícios inerentes a esta tecnologia, incluindo as quantidades mínimas de solução necessária, a rápida medição, o fácil manuseamento, e o custo reduzido.

Como substrato foi utilizado papel de cromatografia Whatman nº 1, devido às suas propriedades hidrofílicas que permitem uma fácil circulação dos fluidos. No entanto este papel é extremamente irregular, pelo que pode ter contribuído para a fraca reprodutibilidade que os eléctrodos apresentaram.

Neste trabalho foram utilizados biossensores de segunda geração. Por isso, um dos parâmetros essenciais ao seguimento deste projecto foi a escolha do doador electrónico da enzima em estudo. Entre os cinco mediadores redox analisados, aquele que apresentou os melhores resultados foi o ferroceno. Este composto, quando incorporado com a pasta de carbono e submetido a temperaturas na ordem dos 60 °C, manteve sempre os picos redox perceptíveis, o seu potencial de redução apresentou valores suficientemente baixos para não comprometer a selectividade electroanalítica, apresentou também uma boa sensibilidade e o limite de detecção estava dentro do limite pretendido. Esta pasta contendo o mediador redox foi utilizada para a impressão do eléctrodo de trabalho.

O fabrico destes dispositivos envolveu três tipos distintos de impressão: impressão a cera, *screen printing* e *inkjet printing*. A impressão a cera permitiu controlar a circulação dos fluídos à área de teste pretendida, uma vez que tornou o papel hidrófobo, e por isso apenas nas zonas onde não foi impressa cera era possível a circulação dos fluídos. Este é um método rápido, eficiente, barato e ecológico. O *screen printing* foi utilizado, para a impressão dos “fios” condutores e dos vários eléctrodos. Esta impressão é versátil, de baixo custo e permite a produção em grande escala, no entanto neste projecto esta foi realizada à mão com a utilização de pinceis, e sem a utilização da rede porosa, o que poderá ter contribuído para a fraca

reprodutibilidade verificada nos dispositivos. A última técnica utilizada foi o *inkjet printing*, esta técnica foi utilizada para a impressão da glucose oxidase. Utilizando esta técnica foi possível imprimir com precisão a enzima sobre o eléctrodo de trabalho, utilizando quantidades reduzidas de solução, e reduzindo os riscos de contaminação.

Neste projecto foi possível visualizar uma resposta electroquímica à adição de glucose (8 mM – 30 mM) sobre os dispositivos produzidos, pelo que se demonstrou a viabilidade dos mesmos. Estes dispositivos são reconhecidos pela máquina comercial *TRUETrack™ blood glucometer*. No entanto foi possível verificar que as correntes produzidas estavam abaixo do limite de detecção do aparelho, podendo isto dever-se à concentração de mediador ou ao potencial do mesmo. A optimização destas correntes para que se possam enquadrar no intervalo de detecção do *TRUETrack™ blood glucometer* é um trabalho que poderá vir a ser desenvolvido no futuro.

A temática dos biossensores é um assunto que apresenta constantes evoluções. Como tal, existem uma série de tópicos que, com maior ou menor importância, deverão ser abordados. Exemplo disso é a actividade da enzima após ser submetida ao processo de impressão, ou a utilização de diferentes enzimas.

Estes dispositivos foram, neste projecto, aplicados para a detecção de glucose, mas nada invalida que num futuro estes possam vir a ser aplicados para a detecção de outros analitos, usando enzimas alternativas e mediadores electrónicos adequados.

1. UIC-University of Illinois at Chicago, Department of Pathology. 2011. Available at: http://pathology.uic.edu/clinical_pathology/POCTesting.asp.
2. Roche D. Biosensor for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) in Point-of-Care Testing (POCT). Available at: <http://www.fuentek.com/images/TDM/TDM-brochure.pdf>.
3. Price CP. Clinical review Point of care testing. 2001;4.
4. Altieri MF, Camarca M. Point of Care Testing.1998;5.
5. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*. 2010;39(5):17. doi:10.1039/b714449k.
6. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem*. 2010;82(1):3–10. doi:10.1021/ac9013989.
7. Liana DD, Raguse B, Gooding JJ, Chow E. Recent advances in paper-based sensors. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):11505–26. doi:10.3390/s120911505.
8. Metters JP, Kadara RO, Banks CE. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. *Analyst*. 2011;136(6):1067–76. doi:10.1039/c0an00894j.
9. Delaney JT, Smith J, Schubert US. Inkjet printing of proteins. 2009;(May):4866–4877. doi:10.1039/b909878j.
10. Digital print preservation portal. Available at: <http://www.dp3project.org/technologies/digital-printing/inkjet>.
11. Vaught JL, Cloutier FL, Donald DK, Meyer JD, Tacklind CA, Taub HH. Thermal ink jet printer. 1984;11.
12. Applications of Electrostatics. In: *College Physics*. First. Available at: <https://www.inkling.com/store/book/college-physics-openstax-college-1st/?chapterId=b20ab9471a6d46109084f657119d0251>.
13. Tudorache M, Bala C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(3):565–78. doi:10.1007/s00216-007-1293-0.
14. Nascimento V, Angnes L. Eletrodos fabricados por “silk-screen.” 1998;21(5).
15. Tudorache M, Bala C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applicaions in environmental and food analysis. 2007.
16. Tymecki L, Glab S, Koncki R. Miniaturized, Planar Ion-selective Electrodes Fabricated by Means of Thick-film Technology. *Sensors*. 2006;6(4):390–396. doi:10.3390/s6040390.

17. Schofield Printing, inc. Available at: <http://www.schoprint.com/screenprinting.html>.
18. Arnold MA, Meyerhoff ME. Recent Advances in the Development and Analytical Applications of Biosensing Probes. *Crit Rev Anal Chem*. 1988;20.
19. Yoo E-H, Lee S-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel)*. 2010;10(5):4558–76. doi:10.3390/s100504558.
20. International Union of Pure and Applied Chemistry. Available at: <http://www.iupac.org/>.
21. Almeida MG. Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions For New Problems. *submitted, not Publ*.
22. Eggins B. *Biosensors An Introduction*.; 1996:212.
23. Kissinger PT. Biosensors-a perspective. *Biosens Bioelectron*. 2005;20(12):2512–6. doi:10.1016/j.bios.2004.10.004.
24. Ispas CR, Crivat G, Andreescu S. Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis. *Anal Lett*. 2012;45(2-3):168–186. doi:10.1080/00032719.2011.633188.
25. Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W. *Amperometric Biosensors*.; 2011.
26. Yoo E, Lee S. Correction: Yoo, E.H., et al. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* 2010. 2010.
27. Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS : RECOMMENDED Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification (Technical Report). 1999;71(12):2333–2348.
28. Pohanka M, Republic C. Electrochemical biosensors – principles and applications. 2008:57–64.
29. Wilson R. Review article Glucose oxidase : an ideal enzyme. 1992;7:165–185.
30. Leskovac V, Trivić S, Wohlfahrt G, Kandrac J, Pericin D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(4):731–50. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.014.
31. Wang J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis*. 2001;13(12):983–988. doi:10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#.
32. Costa M. Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores. 2012:138.
33. Cho HN, Whiting D, Guariguata L, et al. *IDF Diabetes Atlas*. sixth. (Guariguata L, Nolan T, Beagley J, Linnenkamp U, Jacqmain O, eds.); 2013:160.
34. Côté GL, McNichols RJ. Glucose Diagnostics. In: *Biomedical Diagnostics I*.; 2003.
35. Feldman B. ELECTROCHEMICAL BLOOD GLUCOSE TEST STRIPS FOR PEOPLE WITH DIABETES. 2009:1–8.

36. Heller A, Feldman B. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem Rev.* 2008;108(7):2482–505. doi:10.1021/cr068069y.
37. Bankar SB, Bule M V, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase--an overview. *Biotechnol Adv.* 2009;27(4):489–501. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
38. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. second. Texas; :833.
39. Wang J. Analytical Electrochemistry. In: Vol 3. 2nd ed.; 2000:28–59.
40. Fisher AC. *Electrode Dynamics*.; 1996.
41. Andrienko D. Cyclic Voltammetry. In: ; 2008:12.
42. Rahman MM, Ahammad a JS, Jin J-H, Ahn SJ, Lee J-J. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors (Basel)*. 2010;10(5):4855–86. doi:10.3390/s100504855.
43. C. Wayne J. Color Solid Ink Printing. Available at: http://www.imaging.org/ist/resources/tutorials/solid_ink.cfm.
44. Xerox Corporation: "Solid Ink Frequently Asked Questions." Available at: <http://www.office.xerox.com/solid-ink/solid-ink-faq/enus.html>.
45. Radhi MM, Jaffar Al-Mulla E a., Tan WT. Electrochemical characterization of the redox couple of Fe(III)/Fe(II) mediated by grafted polymer electrode. *Res Chem Intermed.* 2012;40(1):179–192. doi:10.1007/s11164-012-0954-6.
46. Kobayashi Y, Hoshi T, Anzai J. Glucose and lactate biosensors prepared by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and mannose-labeled enzymes: electrochemical response in the presence of electron mediators. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001;49(6):755–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411531>.
47. Nie Z, Deiss F, Liu X, Akbulut O, Whitesides GM. Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers. *Lab Chip.* 2010;10(22):3163–9. doi:10.1039/c0lc00237b.
48. Nie Z, Deiss F, Liu X, Akbulut O, Whitesides GM. Supplementary Information for : Integration of Paper-based Microfluidic Devices with Commercial Electrochemical Readers. 2010:1–19.
49. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst.* 2011;136(1):77–82. doi:10.1039/c0an00406e.

A.1 Microfluídica

A microfluídica é uma área da ciência que lida com o fluxo de líquidos com volumes na ordem dos nano ou microlitros em canais de tamanhos na escala dos micrómetros. A microfluídica pode ser considerada tanto como uma ciência(estudo do comportamento de fluídos em micro canais) como uma tecnologia(fabricação de dispositivos de microfluídos para aplicações tipo lab-on-a-chip).³²

A taxa de penetração de um líquido num tubo por acção capilar é demonstrada pela equação de Washburn. Esta é proporcional ao raio capilar, ao ângulo de contacto, ao rácio entre a tensão de superfície e a viscosidade e inversamente proporcional ao comprimento do percurso já preenchido pelo líquido. Quando o ângulo de contacto é inferior a 90° a taxa de penetração é independente do ângulo de contacto. Para materiais porosos que se comportam como um conjunto de capilares cilíndricos, a equação de Washburn descreve a penetração do líquido em função do tempo.³²

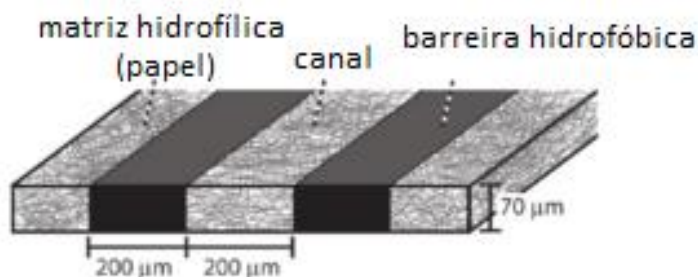


Figura A. 1- Esquema de um canal microfluídico impresso em papel (adaptado de ⁶)

Uma das técnicas utilizadas para construir canais microfluídicos em filtros de papel é a fotolitografia. A fotolitografia em papel requer seis passos e produz barreiras hidrofóbicas bem definidas de materiais fotosensíveis que se estendem através da espessura do papel(Figura 4).

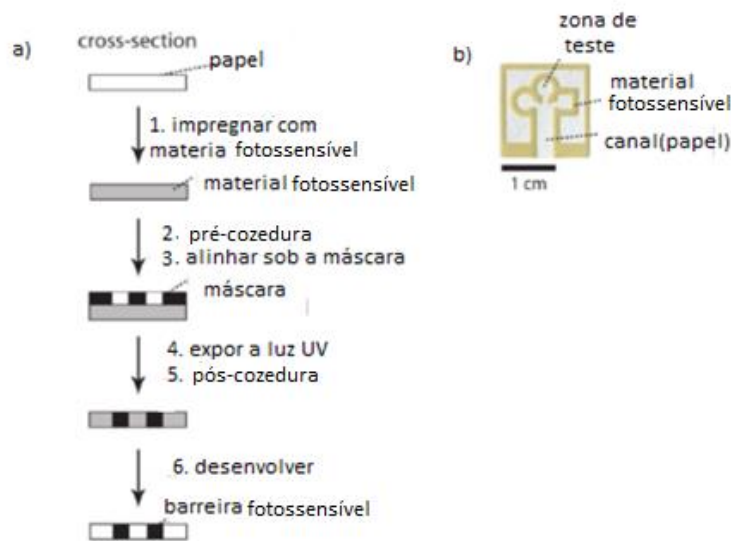


Figura A. 2- a) esquema do processo de fotolitografia; b) exemplo de dispositivo fabricado por litografia(adaptado de ⁶)

Outra técnica utilizada na microfluídica é a impressão a cera. Neste processo cera sólida é impressa utilizando uma impressora Xerox ColorQube 8570 de tinta sólida. A cera impressa é então difundida no papel para formar barreiras hidrófobas utilizando apenas uma placa de aquecimento, Figura 6. O método de impressão a cera para fabrico de dispositivos microfluídicos baseados em papel é rápido, barato, simples, e adequado para países em desenvolvimento. Este método pode ser útil tanto para o método de detecção colorimétrico como electroquímico.⁴⁹

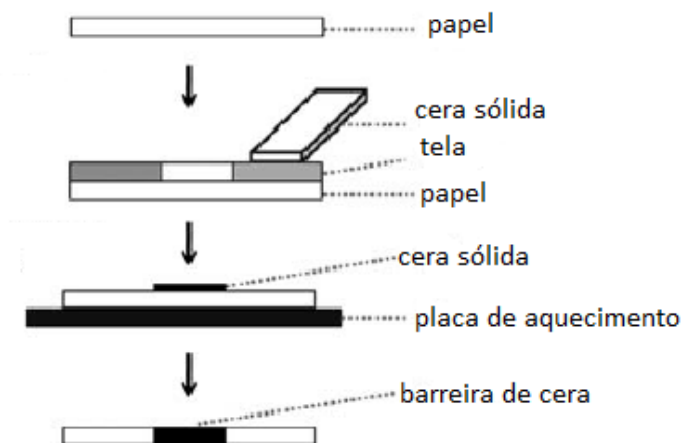


Figura A. 3- esquema da impressão a cera(adaptado de ⁴⁹)